

# オクタカルシウムフォスフェート・コラーゲン複合体（OCP/Col）による垂直的骨造成

著者	柳沢 俊樹
学位授与機関	Tohoku University
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/00131185">http://hdl.handle.net/10097/00131185</a>

東北大学大学院医工学研究科

# 博士論文

博士（医工学）

オクタカルシウムフォスフェート・  
コラーゲン（OCP/Col）複合体による  
垂直的骨造成

柳 沢 俊 樹

2020 年 8 月



修了年度	2020 年度	課 程	博士後期課程 3 年の課程
英文    Abstract			
Title:	Appositional bone formation by octacalcium phosphate and collagen composite		
Author:	Toshiki YANAGISAWA		
Supervisor:	Shinji KAMAKURA		
<p>The conventionally prepared octacalcium phosphate and collagen composite (OCP/Col) has exhibited excellent bone regeneration and has recently been commercialized for treating bone defects. However, it has never been achieved sufficient appositional bone formation, because the implanted material was collapsed due to its poor mechanical properties or resorption by multinucleated giant cells (MNGCs) with time. At first, it was prepared OCP/Col disks treated with parathyroid hormone (PTH) and covered with a poly-lactic acid (PLA) cage, because it was postulated the alleviation of mechanical stress by PLA cage and the enhancement of bone regeneration by PTH. Then, it was investigated the possibility of appositional bone formation if the prepared disks were implanted into subperiosteal pockets of rodent calvaria. The PLA cage enabled to maintain the shape of the implants and inhibited the invasion of fibrous tissue into the implants. New bone was formed from the original bone and along the PLA cage, and the sufficient appositional bone formation was accomplished. However, the PLA cage implanted with OCP/Col was needed to be removed, because it remained for long periods of time. To resolve the problem, it was changed the pre-freezing conditions and the density of OCP/Col during preparation. Then, the altered OCP/Col was implanted into subperiosteal pockets of rodent calvaria, and investigated whether it independently enhanced appositional bone formation. The pre-freezing of OCP/Col by liquid nitrogen maintained the shape of implants for the inhibition of the resorption of OCP/Col and secured scaffold for bone formation. The shape of implants became stable and the appositional bone formation increased along with growing density of OCP/Col. These results suggest that the altered OCP/Col would independently enhance appositional bone formation.</p>			
和文アブストラクト			
<p>論文題目：オクタカルシウムフォスフェート・コラーゲン複合体 (OCP/Col) による垂直的骨造成</p> <p>提出者氏名：    柳沢    俊樹</p> <p>指導教員：       鎌倉    慎治</p>			
<p>OCP/Col は優れた骨再生能と生体吸収性を有し、骨欠損を対象として既に製品化されているが、外力や多核巨細胞 (MNGCs) による吸収による試料変形のため、有効な垂直的骨造成は達成できていない。</p> <p>本研究では、はじめに、外力を緩和するためにポリ乳酸 (PLA) ケージで OCP/Col で被覆し、さらに骨再生能を促進するために、副甲状腺ホルモン (PTH) を滴下した試料を準備した。そして、それらをラット頭蓋冠上の骨膜下に埋入し、垂直的骨造成が可能かどうかを検討した。PLA ケージの被覆によって、OCP/Col の形状は維持されるとともに、OCP/Col 内への線維組織の侵入を阻害した。新生骨は既存骨表面あるいは PLA ケージに沿って形成され、結果的に有効な垂直的骨造成を達成することができた。しかし、OCP/Col に PLA を併用する場合、PLA が体内に長期間滞留するため、摘出する必要がある。</p> <p>そこで、この課題を解決するため、OCP/Col 作製時の予備凍結条件や試料密度を変更することで、OCP/Col 単独で垂直的骨造成が可能かどうかを、ラット頭蓋冠上の骨膜下に埋入し検討した。予備凍結を液体窒素冷却で行うことで、MNGCs による吸収を抑制し、骨形成に必要な足場が確保でき、形状が保持された。そして、OCP/Col 濃度を増加させることにより、さらに形状が安定し、新生骨形成量も増加し、OCP/Col 単独による垂直的骨造成の可能性が示唆された。</p>			

# 目次

第1章	序論	1
1.1	再生医療と足場材料	2
1.1.1	再生医療とは	2
1.1.2	組織工学 (Tissue Engineering)	2
1.1.3	細胞	3
1.1.4	シグナル分子	4
1.1.5	Scaffold (足場材料)	4
1.1.6	Scaffold の材料 (生体材料) について	5
1.1.7	Scaffold の材料設計	6
1.2	骨再生と骨補填材 (人工骨)	7
1.2.1	骨再生治療	7
1.2.2	骨移植	7
1.2.3	骨補填材 (人工骨)	7
1.2.3.1	ハイドロキシアパタイト (HAp)	8
1.2.3.2	$\beta$ -リン酸三カルシウム ( $\beta$ -TCP)	8
1.2.3.3	炭酸アパタイト ( $\text{Ca}_{10-a}(\text{PO}_4)_{6-b}(\text{CO}_3)_c(\text{OH})_{2-d}$ )	9
1.2.3.4	リン酸系カルシウムと生体分解高分子材料との組合せ	9
1.2.4	骨伝導能と骨誘導能	10
1.2.5	人工骨の課題	
1.3	オクタカルシウムフォスフェート・コラーゲン (OCP (Octacalcium phosphite)/Collagen) 複合体	11
1.3.1	オクタカルシウムフォスフェート (OCP: $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	11
1.3.2	オクタカルシウムフォスフェート・コラーゲン複合体 (Octacalcium phosphate・Collagen composites (OCP/Col))	11
1.4	骨造成法	14
1.4.1	GTR, GBR, 仮骨延長法による骨造成法	14
1.4.2	シグナル分子による骨造成法	14
1.4.3	人工骨による骨造成法	15
1.4.4	OCP/Col を用いた垂直的骨造成	16
1.5	本研究の目的	18
第2章	PLAで被覆したオクタカルシウムフォスフェート・コラーゲン (OCP/Col) 複合体の垂直的骨造成	19
2.1	緒言	20
2.1.1	PTFE の被覆による OCP/Col の形状保持と新生骨形成	20
2.1.2	TPTD 滴下による OCP/Col の骨再生向上	22
2.1.3	骨膜の新生骨形成への影響	23
2.1.4	本章の目的	23

2.2 実験方法	24
2.2.1 オクタカルシウムフォスフェート・コラーゲンの作成方法	24
2.2.2 ポリ乳酸 (PLA) ケージ	25
2.2.3 テリパラチド酢酸塩	26
2.2.4 ラットへの移植方法	27
2.2.5 マイクロ CT 撮影方法	28
2.2.6 病理組織標本の作成及び組織形態計測	28
2.2.7 組織定量学的解析	28
2.2.8 統計解析方法	29
2.3 結果	30
2.3.1 マイクロ CT 撮影	30
2.3.2 組織的観察	31
2.3.3 組織学的形態計測による定量解析	36
2.4 考察	38
2.5 結論	40
2.6 新生骨率算出方法（詳細）	41
2.7 第 2 章の測定結果（全試料）	45
第 3 章 垂直的骨造成におけるオクタカルシウムフォスフェート・コラーゲン複合体 (OCP/Col) 製造時の予備凍結条件と密度の影響	51
3.1 緒言	52
3.1.1 第 2 章及び人工骨単独使用による課題	52
3.1.2 生体材料に液体窒素（冷却）を施した場合の効果	52
3.1.3 生体組織に液体窒素（冷却）を施した場合の効果	52
3.1.4 生体材料における密度と強度の関係	53
3.1.5 本章の目的	53
3.2 実験方法	54
3.2.1 OCP/Col の作成方法	54
3.2.2 ラットへの移植方法	55
3.2.3 マイクロ CT 撮影方法	56
3.2.4 組織学的観察	56
3.2.5 組織定量学的解析	57
3.2.5.1 形状解析	57
3.2.5.2 新生骨比率 (n-Bone%)	58
3.2.6 統計解析方法	58
3.3 結果	59
3.3.1 マイクロ CT 撮影	59
3.3.2 定量解析（高さ）	62
3.3.3 定量解析（角度）	65
3.3.4 組織学的観察	66
3.3.5 組織学的形態計測による定量解析	73
3.4 考察	74
3.5 結論	76
3.6 第 3 章の測定結果（全試料）	77

第4章 総括	93
4.1 本研究のまとめ	94
参考文献	96
業績（学位論文に関する研究業績）	104
1. 学位論文（査読付き）	
2. 国際会議	
3. 国内会議	
その他研究業績	
1. 学位論文	
2. 国際会議	
3. 国内会議	
謝辞	107



## 第1章 序論

## 1.1 再生医療と Scaffold（足場材料）

### 1.1.1 再生医療とは

20世紀に世界の医療は大きく発展したが，今日においても難病や障害，臓器移植でのドナー不足に苦しむ患者は多い。これらに対応する根本治療の実現に向けたさらなる革新的な医療技術の開発が必須であり，その実現は世界の大きな関心事となっている。このような状況の中で革新的医療技術である再生医療への期待は大きなものとなっている。再生医療とは，イモリのしっぽが再生する再生現象をヒトで誘導し，病気や事故により機能不全に陥った組織や臓器の機能を再生して，本来必要な組織機能を回復させ，患者の

QOL(quality of life) を維持する新世代の医療医療である。その基本コンセプトは，細胞の増殖，分化能力を高め，自然治癒力を介して生体組織を再生修復させることである (1, 2)。現在では，Tissue Engineering（組織工学），幹細胞工学，遺伝子治療などの技術を用いて，組織・器官・臓器を再生する「再生医療」を含める場合が多い (3)。本章では，上記の中で特に再生医療に関連する Tissue Engineering とそれに関連する，細胞，シグナル分子及び Scaffold（足場材料）について以下に述べる。

### 1.1.2 組織工学 (Tissue Engineering)

1980年代後半，Harvard 大学の Vacanti は，皮膚のように薄い組織ではなく，肝臓のように分厚い臓器を作ることを目指して，三次元的な細胞の足場を作り，これを細胞に播種して培養した後に移植に供するという新しい手法を提案した (4)。1993年には Massachusetts Institute of Technology (MIT) の Langer と Harvard 大学の Vacanti らにより，生体吸収性のポリグリコール酸不織布からなる Scaffold（足場材料）に軟骨細胞を播種してヌードマウスの皮下に埋入することで，異所的な軟骨の再生を誘導できることが示唆され，共著で Science 誌に「Tissue Engineering」と題する総説を発表し，Tissue Engineering の概念が提唱された (5)。Tissue Engineering は，医学，工学，生物学の協力により，細胞とその足場となる生体吸収性材料とを融合，一体化させることによって，失われた組織・臓器の再生，修復を目指す学際的領域である。これによって，生体機能を代替する製品の製作が可能となった。米国において始まったこのような Tissue Engineering 研究は全世界へと広がり，次世代の再建外科における新しい治療戦力となることが期待されている。Tissue Engineering において，組織再生には①細胞，②シグナル分子，③Scaffold の3要素が必要とされてきた（図1）。

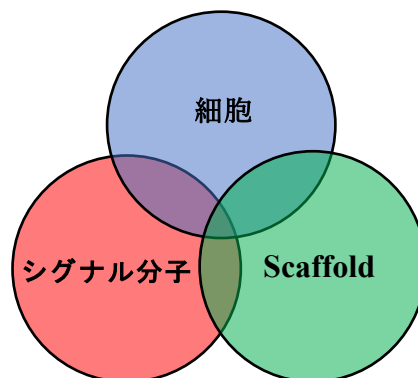


図1:再生医療を実現するための3要素

### 1.1.3 細胞

細胞そのものを用いた組織再建や細胞から分泌される生理活性物質に着目した治療を「細胞治療」と呼び、幹細胞が主要な役割を担う。幹細胞は「多分化能（様々な機能をもった細胞に分化する能力）」と「自己複製能（多分化能を維持したまま分裂をする能力）」という2つの特徴を合わせもった未分化な細胞で、幹細胞としての能力を維持しながら組織や臓器を構成する細胞を生み出し、発生、修復、維持を行なっている細胞である。この幹細胞は、大別すると組織幹細胞と多能性幹細胞に区分される。組織幹細胞は、特定の組織・臓器を構成する細胞にのみ分化する能力を持つ幹細胞であり、多能性幹細胞は胎盤と羊膜以外の全ての細胞に分化できる幹細胞である(6)。細胞治療の歴史は、血液細胞を用いた治療から始まり、1970年代には、難治性骨髄性疾患に対し、組織幹細胞である造血幹細胞(7)を患者に輸注する治療方法が確立し、その後の骨髄バンクや体性幹細胞を用いた再生医療につながっている。この他、1990年代後半にOsiris Therapeutic社のPitingerらが骨髄中の培養皿に付着する細胞に、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞などの間葉系の細胞に分化できる幹細胞が存在することを見出し、この間葉系幹細胞(mesenchymal stem cells: MSCs)が組織再生に応用できる細胞として注目を集めるようになった(8)。また、2次元基材上に接着したMSCsが基材の状態(電荷・硬さ・形状)により増殖・分化が変わる特徴があり(2,9)、現在はScaffoldに播種するなど広く用いられている。

1990年代後半には、組織幹細胞に比べて、分化能力が高く、様々な細胞に分化可能な多能性幹細胞の研究が進み、Wisconsin大学のThomsonが胚性幹細胞(ES細胞: Embryonic stem cell)を樹立した(10)。しかし、ES細胞は生きた受精卵を壊す必要があるため、倫理面での問題が指摘されていた。そこで、2000年代後半に京都大学の山中伸弥教授がヒトの受精卵を用いない人工多能性幹細胞(iPS細胞: Induced pluripotent stem cell)を樹立し(11)、その治療に世界の注目が集まった。表1に対象の治療や歴史を示す。現在はES細胞やiPS細胞を用いた研究が盛んに行われ、日本ではiPS細胞の分野で、世界に先駆けた臨床研究の開始など研究面において世界をリードしている。一方、2013年に再生医療関連法案も成立し、今後の産業化が期待される。

表1:細胞治療の目的、対象領域及び歴史(6-8, 10, 11)

目的	細胞そのものを用いた組織再建
	細胞から分泌される生理活性物質に着目した治療
対象	神経の治療: アルツハイマー病, パーキンソン病, 事故による脊椎損傷など
	心筋の治療: 心筋梗塞, 心筋症, 筋ジストロフィーなど
	慢性疾患の根本的な治療: 糖尿病, 腎臓病など
歴史	1970年前: 血液細胞を用いた治療が開始される
	1970年代: 造血性幹細胞を患者に輸注する治療方法が確立
	1998年: Wisconsin大学のThomsonがヒトES細胞を樹立
	1999年: Osiris Therapeutic社のPitingerらが間葉系幹細胞を見出す
	2007年: 京都大学の山中伸弥教授がヒトiPS細胞を樹立



#### 1.1.4 シグナル分子

シグナル分子には、生化学的な細胞成長因子のほかに力学的な刺激や電氣的、電磁的な刺激もあるが、ここでは細胞成長因子（サイトカイン）について述べる。細胞成長因子は細胞の増殖因子と分化因子を含んだ広い意味での生化学的刺激因子のことで、タンパク質の一群である。例えば、骨形成タンパク質（BMP ファミリー、種々の BMP の総称）、骨芽細胞を介して間接的に破骨細胞前駆細胞に作用し、分化と活性化を促進する副甲状腺ホルモン（parathyroid hormone; PTH）、内皮細胞や軟骨細胞の増殖も促進する塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)、上皮細胞の遊走や癒痕形成阻止と関係する形質転換増殖因子(TGF- $\beta$ ファミリー)、上皮細胞増殖因子(EGF)、血小板由来増殖因子(PDGFファミリー)、肝細胞増殖因子(HGF)、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)などが再生医療と深い関係がある(8, 12-14)。

#### 1.1.5 Scaffold（足場材料）

Scaffold とは細胞の増殖を支持する（足場となる）基材の事である。基材を損傷部位に留置しておき、その基材が細胞の密着や増殖の足場として機能することで組織の再建を助けている。医療機器の概念に近い。Scaffold は Tissue Engineering の主要な三要素の一つとされ、2001年には Biological Scaffold の名前で広く認知されることとなった。しかし、その定義は明確に存在しない。Biological Scaffold は、①細胞外マトリックス (Extracellular matrix: ECM) 等の生体由来タンパク質から作製された生体由来(Bio-derived) Scaffold, ②生体が本来有する組織接着性や生理活性などを示す機能性を搭載した生体模倣 (Bio-mimetic) Scaffold, ③ヒトや動物の組織から生体成分を除去して ECM のみを残した脱細胞 (Acellular) Scaffoldなどを指し示す言葉である(15)。生体は細胞とその周辺環境からなっている。いかに能力のある細胞でも、その周辺環境が整っていなければ本来の能力を発揮することは極めて難しい。現在、Bio-derived Scaffold では増殖と分化能力の高い細胞の利用が可能になってきている。しかしながら、細胞をただ体内に注入するだけでは、細胞はうまく働かず、生体組織の再生修復が期待できない場合も多い。これは、細胞の生存とその生物機能発現には、細胞とその周辺環境との相互作用が必要不可欠であるからである。この細胞周辺環境を作り与えることが Tissue Engineering の重要な役割であり、細胞の増殖と分化を促すための基幹となるのが生体材料 (Biomaterial) である。再生医療は細胞の治療あるいは研究への応用であると考え、細胞だけでなく、細胞の能力を最大限発揮させるため、体内環境に近い周辺環境を与える Biomaterial 技術が必要不可欠であり、Biomimetic Scaffold はその中で重要な位置を占める。

図 2 に細胞治療と Scaffold 関連の歴史をまとめた。

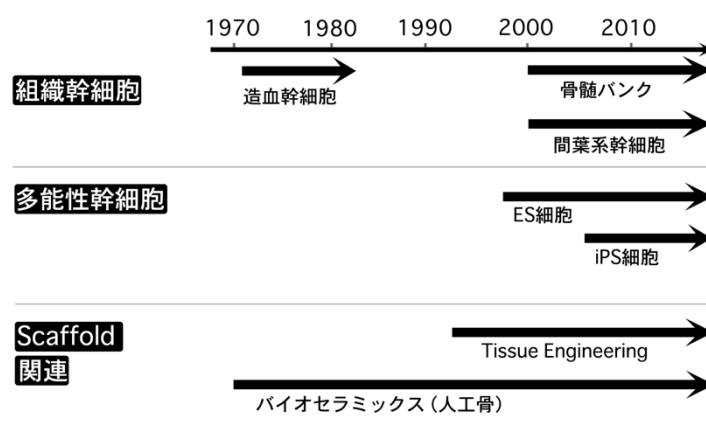


図2: 細胞治療と Scaffold 治療の歴史(7, 8, 10, 11, 16)

#### 1.1.6 Scaffold の材料（生体材料）について

生体材料を表2にまとめた。金属材料としては、チタンやステンレス鋼，Co-Cr合金が骨折固定などに使用され，人工関節では非吸収性合成高分子材料の超高分子量ポリエチレンなどが使用されている。また，Scaffold（足場材料）には，骨などの硬組織用と皮膚，軟骨，あるいは角膜などの軟組織用とに大別できる(1)。硬組織用 Scaffold には，主として無機材料のハイドロキシアパタイト (hydroxyapatite:  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ; 以下 HAp) や  $\beta$  リン酸三カルシウム ( $\beta$ -tricalcium phosphate:  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ; 以下  $\beta$ -TCP) などがある（詳細については1.2.3で述べる）。軟組織用 Scaffold には天然高分子材料と合成高分子材料があるが，それらは全て分解吸収性の材料である。現在，骨組織用 Scaffold においても，無機材料と高分子材料と組み合わせて製作された製品が開発されている。生分解吸収性高分子は，生体内で一定期間，ある形状と機能を保った後，酵素的あるいは非酵素的に加水分解され吸収される(17)。医用高分子材料の最も重要な性質は，生体に対する安全性であるが，生分解吸収性高分子 Scaffold の材料においては分解前の材料そのものの生体安全性はもちろんであり，さらに分解物の安全性も要求される。

生分解吸収性高分子材料には天然高分子と合成高分子がある。現在の生分解吸収性材料の代表的な高分子は，天然高分子ではコラーゲンであり，また，合成高分子ではポリ乳酸であるが，決して満足な材料ではなく，改良されなければならない問題点がいくつかある。コラーゲンの問題点としては，主として力学的強度が低すぎることで，また，分解制御が難しい等(1, 12)が挙げられる。一方，ポリ乳酸系は合成物であるため分子量や結晶性を任意に変えられることは特徴的であるが強度低下速度と質量消滅速度が一致しないこと，生理活性物質の除酸化が困難なことなどがあげられる(1)。

表2: 生体材料の代表例

種類	代表的な材料	代表的な用途
金属材料	チタン，ステンレス鋼，Co-Cr合金 など	骨折固定 など
無機材料	HAp( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), $\beta$ -TCP ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) など	人工骨 など
高分子材料	非吸収性(合成)	超高分子量ポリエチレン，フッ素樹脂 など
	吸収性(天然)	コラーゲン，キトサン，ゼラチン など
	吸収性(合成)	ポリ乳酸，ポリグリコール酸 など
		人工関節 など
		再建用膜 など
		縫合糸 など

### 1.1.7 Scaffold の材料設計

生体組織を再生させるためには、細胞工学や細胞生物学と生分解吸収性の生体材料学を用いた先に述べた Tissue Engineering の知識と技術を組み合わせることが必要である。表 3 に再生医療のための材料設計に必要な条件を示す(18)。これらのいくつかの条件を満足させることで、目的に応じた種々の細胞を播種、または生体内で細胞が付着し、それらの細胞が生体内分解吸収性マトリックス上で 3 次元的に増殖させることにより、種々の組織や臓器が再生できる。この細胞増殖の足場となる生分解吸収性高分子材料としては、先に述べた天然のものとしてコラーゲンやキトサン等、また、合成のものとしてポリ乳酸系がそれぞれ単独あるいは複合体の形でよく用いられている。目的に応じて分解吸収が比較的速い用途には、コラーゲンやキトサンが用いられ、一方、分解吸収が比較的遅くある程度の力学的強度を必要とする場合の用途にはポリ乳酸系の生体材料が適している。また、この場合のマトリックスは目的に応じてゲル状、スポンジ状、メッシュ状、あるいは線維状など様々な形状に成型加工されて用いられている (1)。

表 3: 再生医療のための足場材料設計に必要な条件 (18)

1. 細胞機能が発現できる環境の設計
・細胞の接着，増殖足場としての細胞外マトリックスの設計
・物理的刺激（圧力，機械的応力，磁場，電場など）の設計
2. 細胞が集団化して組織として機能するための構造設計
・重層化，断層化，配向化などの設計
3. 各種組織に対する巨視的形状の設計
・管状，シート状，ブロック状などの設計
4. 足場材料が生体内分解吸収性であり，最適分解性や力学的性質の設計

## 1.2 骨再生と骨補填材（人工骨）

### 1.2.1 骨再生治療

様々な骨欠損や骨喪失に対する治療法の開発は歯科・口腔外科・整形外科・脳神経外科など多くの領域で重要な課題であり，例えば，歯科・口腔外科領域では，顎骨腫瘍切除等の骨欠損，歯周病等の病的骨吸収，委縮歯槽堤といった様々な骨欠損・喪失の修復が対象となる。通常，抜歯窩などの小さな欠損は自己修復機能で補われる部分が多く，機能障害が顕在化しないため問題視されることは少ない。しかし，自己修復の望めない大きな欠損に対しては，それらを放置することで，食事が難しい（摂食障害），喋りにくい（構音障害），多彩な表情を作れない（審美的障害）が残る。これらの不具合は，直接生死に関わる問題ではないが，QOLの低下に繋がる。従って，欠損部を材料で修復する治療法が行われている。

骨修復においても Tissue Engineering の主要な三要素である「細胞」，細胞の分化・増殖を制御する「シグナル分子」，及び前二者の機能を発揮させる「Scaffold（足場材料）」が重要な役割を演じ，これら三要素の協調によって効率的な骨修復が行われることが明らかになってきた。細胞治療やシグナル分子による骨修復は有望な治療法と考えられるが，現状では大きな骨欠損修復では細胞治療単独では局所定着に難があること，同様にシグナル分子単独投与も，それらの拡散により期待する骨再生効果が得られていないことから，骨原生細胞の定着や機能発揮，シグナル分子の保持と効果的な拡散が可能な細胞外基質の代用となりうる「Scaffold」の開発が注目されている。

### 1.2.2 骨移植

従来から骨再生治療の現場では，広範囲の骨欠損や複雑な骨折においては自然治癒が期待できないため骨の移植（骨移植）手術が行われる。骨移植には，自身の骨を移植する方法（自家骨移植），他人の骨を移植する方法（他家骨移植）などがある(19)。

自家骨移植は骨の再生が最も期待できるが，健常部を侵襲して骨を採取しなければならず，その量にも限りがあり，患者及び術者双方にとって大きな負担を強いる。すなわち，採骨のために外科的侵襲の無用な部位にメスを加えること，採骨量に制限があり広範な骨欠損では対応不能なこと，手技的に簡便ではなく入院加療が付随することも多い(20)。他家骨移植は貯蔵した骨を用いるため，大量に使用できるという利点があるが，製品の不均一，移植免疫反応さらに感染のリスクが高いという問題がある(19)。

### 1.2.3 骨補填材（人工骨）

人工骨とは，人工的に合成，作成された代替骨で，量の制限や感染症などのリスクがない。人工骨の開発は18世紀頃から行われ，当初は金，白金といった貴金属や鉄などの金属が用いられ，その後，ステンレス鋼や種々の合金が用いられていた。しかしながらステンレス鋼等の金属材料には生体適合性がないため，骨欠損部の補填材料として好ましくなく，生体より異物と認識され拒絶反応が起こる等の問題があった。金属材料以外では，古くから石膏（硫酸カルシウム）が使用されたことが知られているが，1970年代には硬組織修復用バイオマテリアルとしてセラミックスの研究開発が進んだ。1980年代ではHApや $\beta$ -TCP

など様々のバイオセラミックスによる人工骨が臨床応用された(21)。近年では、炭酸アパタイト(22)や、HApと生体分解性合成材料とを組み合わせた製品が開発された(23) (表4)。

#### 1.2.3.1 ハイドロキシアパタイト (HAp)

骨などの生体組織との間で強い化学結合が起こり、周辺の骨と結合することが知られている(24)。このアパタイトの表面には生体内で骨に似たアパタイトの層を形成するので、異物としての拒絶反応は軽減し、逆に骨芽細胞が増殖して周辺に新しい骨(新生骨)が形成される。この新生骨が元々の骨と人工材料であるアパタイトを結合する働きとして一体化する。このように人工骨の周りに生体由来の骨が形成され一体化されていく。HApは化学的に合成することができるが、これを焼き固めて成型する技術(焼結)が日本国内で開発され、HAp人工骨の開発が加速された(16, 25)。1980年代には、世界に先駆けてHAp製人工骨が国内で実用化された。最も一般的なタイプのHAp製人工骨は、組織の侵入性を高めるため気孔体である。ネオボーン®(コバレントマテリアル)は、気孔間の連通性に主眼を置いて開発された人工骨であり、75%前後の高気孔率、高い気孔間連通性に加え、良好な術前加工性や術中創作性を同時に実現している(26, 27)。アパラセラム-AX®(HOYA)は85%の超高気孔率と高い気孔間連通性、数ミクロンからナノメータサイズのマイクロポアを有する(28)。多孔体が強度を犠牲にして組織の侵入性を向上させているのに対し、強度を優先させて形成したものが緻密体である。しかしながら、緻密体は圧縮強度が十分なものの靱性が低く脆いため加工ができず、特定の用途専用設計され、汎用性の無いものも多い。

#### 1.2.3.2 $\beta$ -リン酸三カルシウム( $\beta$ -TCP)

$\beta$ -TCPはHApとは体液中での分解吸収性がそれぞれ異なり、HApに比べて中性域での溶解度が高い。HAp製人工骨は吸収速度が非常に緩徐で、実質的には非吸収性である。 $\beta$ -TCPはHApに比べて溶解度が高く吸収されやすく、さらに生体骨と同様に破骨細胞によって溶解・吸収されると考えられている(29)。骨欠損部に移植すると徐々に吸収されるが、72週後も残存することがある(29)。しかし、移植後数年で骨に置換吸収されるため、市場占有率も拡大傾向である。例えば、 $\beta$ -TCP製で同様に高い気孔間連通性とマイクロポアを有する多孔性人工骨オスフェリオン®(オリンパステルモバイオマテリアル, 1999年)も気孔内への速やかな組織侵入と骨形成が起こるが(30)、初期強度は小さく、海綿骨欠損部に埋植した場合、その後も強度は増大しない。しかし、材料そのものの吸収はきわめて速く、半年から1年でほぼ消失する。その後、75%の気孔率と、高い気孔間連通性で圧縮強度を高めた「スーパーポア®」(HOYA, 2010年)が上市されている。さらに、配向連通気孔構造を有する「アフィノス」(クラレ, 2015年)は、連通気孔が再生骨で満たされ $\beta$ -TCPが吸収することで、元来の骨組織と類似した構造になることが期待されている(31)。

### 1.2.3.3 炭酸アパタイト ( $\text{Ca}_{10-a}(\text{PO}_4)_6-b(\text{CO}_3)_c(\text{OH})_{2-d}$ )

骨組織の主たる無機成分はHApではなく、炭酸アパタイトであると考えられる(32)。低結晶性炭酸アパタイトは基礎的実験でHApに比べて、有効な骨伝導性を示すことが示されており(22)、最近、「サイトランスグラニュール」(ジーシー、2018年)として、国内初の歯科用インプラント埋入に伴う治療において適用が認められている。生体内に埋入すると早期の骨形成を促すとともに、新生骨がインプラント体と直接結合すると言われている。加えて、それらは経時的に患者自身の骨へ効率的に置換されることが期待されている。

### 1.2.3.4 リン酸系カルシウムと生体分解高分子材料との組合せ

近年、従来から顆粒状やブロック状多孔体ではなし得なかった優れた操作性や加工性を具備した有機・無機複合材料が開発、実用化されている。リフィット (HOYA、2014年) はHApと骨組織の主たる有機成分であるタイプIコラーゲンの複合材料で、骨組織と類似した多孔質HAp・コラーゲン複合体 (HAp/Col) である。それらはブタ皮膚由来のコラーゲンと水酸化カルシウムを反応させ、生体骨と同様のナノ構造を有している。HApとコラーゲンの重量比は80:20と生体骨と同等(23)で、気孔率は95%と高く、スポンジ状に形成したものをを用いる。従来の多孔質人工骨に比べ、機械的性質は極めて低いが、弾性と優れた操作性、加工性を有し、動物実験では既存の人工骨よりも高い骨伝導率と、良好な吸収置換性が確認され(33)、治験においても、 $\beta$ -TCPよりも高い有効性が確認されている(34)。

表4: 生体内活性人工骨と生体内吸収性人工骨(21)

バイオセラミックス	製品名	メーカー名	組成	気孔率	圧縮強度
ハイドロキシアパタイト	ネオボーン	コバレントマテリアル	HAp	75%	10 MPa
	アパセラム-AX	HOYA	HAp	85%	2 MPa
生体内分解材料	オスフェリオン	オリンパステルモ バイオマテリアル	$\beta$ -TCP	75%	2~5 MPa
	スーパーボア	HOYA	$\beta$ -TCP	75%	5~6 MPa
炭酸アパタイト	サイトランス グラニュール	ジーシー	$\text{CO}_3\text{Ap}$	—	—
HAp + コラーゲン	リフィット	HOYA	HAp + Col	65%	—

#### 1.2.4 骨伝導能と骨誘導能

人工骨による骨再生には骨伝導能と骨誘導能の2つの能力が求められる。骨欠損部に人工骨を移植すると、母床骨から組織が侵入し骨欠損部に骨組織が形成される。この現象を骨伝導といい、この現象を引き起こす能力を骨伝導能（母床骨から移植片に侵入した骨形成細胞により骨形成を誘導する能力）という。骨伝導能は人工骨の性能を表す指標の一つとなっている。骨伝導能以外に骨形成に関する能力を表す言葉として骨誘導能がある。骨誘導能を持つ代表的な薬剤として BMP がある。BMP は骨組織から分離固定された増殖因子で、筋肉内にも拘わらず骨組織が形成される。この骨以外の組織内に骨形成を引き起こす現象を骨誘導（未分化な細胞から骨形成を誘導する能力）という。

#### 1.2.5 人工骨の課題

近年の人工骨の性能向上には目覚ましいものがあり、適用範囲は拡大されつつある。しかしながら、人工骨単独での使用方法、使用部位は、自家骨の場合に比較して制約される。骨折や腫瘍などで生じた海綿骨の骨欠損で周囲の皮質骨が維持されている場合などは人工骨の良い適用で、比較的大きな骨欠損まで人工骨のみで適応できると考えられる。それに対し、巨大な骨欠損の再建や脊椎の固定術、人工関節を設置する手術で母床骨を増生（造成）するために骨移植を行う場合などには、移植部位の周囲は骨以外の組織に囲まれる範囲が大きくなる。そのため、移植部に骨組織が形成されるより早く軟部組織が侵入してしまったり、移植した人工骨が吸収されて無くなってしまったりといったリスクが高くなる。それに対して、自家骨は骨形成能を有する唯一の骨補填剤であり、骨欠損に対するゴールドスタンダードとして捉えられており、それらに代わり得る骨補填剤は存在していない(35)。しかしながら、臨床現場での「自家骨採取術」についての侵襲性や倫理的側面の問題などからも、自家骨に代わり得る人工骨の臨床応用が今日も切望されている。人工骨に求められる特性は、①構造支持体として十分な強度、②手術中の形状調整が可能な加工性・取扱やすさ、③骨組織との高い親和性、④生体内での分解吸収性、⑤骨形成を促進する活性が挙げられる(21)。

このように、人工骨の開発には、難治性の骨欠損に対する新たな治療法としての期待に加え、自家骨移植の適用の一部を人工骨で代替することにより、自家骨採取に伴う不具合の解消が期待される。それとともに日本においては超高齢化社会の到来、欧米・アジアを含む諸外国の人工骨の使用頻度はまだ高くないことから、今後、市場の拡大が予測される。近い将来、日本から自家骨移植をしのぐ優れた技術、製品が発出されて画期的治療法となり、世界の市場、臨床現場で使用されることが期待されている。

## 1.3 オクタカルシウムフォスフェート・コラーゲン複合体 (OCP (Octacalcium phosphate)/Collagen)

### 1.3.1 オクタカルシウムフォスフェート (OCP: $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )

脊椎動物の骨の無機成分の主体はHApを基本構造とする骨アパタイトはリン酸カルシウム的一种である非晶質リン酸カルシウム (ACP) やOCPを前駆体 (Precursor) として経過し形成され则认为られている (36)。そしてOCPは、結晶学的に三斜晶系に属し、アパタイトの構造を有するアパタイト層と水和層が交互に規則的に繰り返され、HApと結晶学的に類似の構造を有し、生理的環境下において加水分解反応によりHApへと不可逆的に結晶構造転換する (36, 37)。また、OCPを骨髓間質細胞と培養するとカルシウムイオンの取り込みとリン酸イオンの放出を伴って、骨分化マーカー (Type I collagen, alkaline phosphatase, osterix など) の発現を增强し、骨形成系細胞への初期段階の分化を促進する (38)。OCPが生体内でアパタイトの前駆物質として働くという点に着目し、人工合成のOCP顆粒も *in vitro* と同様に生体内で骨アパタイトに転換する事で骨再生を図るという試みは当初げっ歯類の骨膜下埋入モデルを用いて行われ (39, 40)、OCPが骨芽細胞やその前駆細胞等に作用する事で骨形成が促進されることが明らかになった (41)。一方、諸外国では、OCPを金属インプラントのコーティング材 (42, 43) や凝集体 (44) として用いる研究が行われてきた。その後、OCPの骨再生能は定量性に優れ自然治癒の望めない大きな実験的骨欠損 (頭蓋冠骨欠損モデル) (45) を用いることで、骨再生材料そのものの性能が明確かつ詳細に明らかにされてきた。すなわちOCP顆粒を同骨欠損モデルに埋入すると経時的に骨欠損部の骨形成が促進されるが、それらは骨欠損部辺縁 (周囲) からの骨形成に加え、欠損内に散在したOCPを核とした新生骨の形成を伴い (46)、それと並行してOCP自身が結晶学的に不可逆的に骨アパタイトに転換する (47)。その後、OCP周囲の新生骨は同心円状の増大を経て癒合し骨欠損を修復していく (48)。したがって、骨欠損部において、OCPが積極的に骨再生に関わり、骨再生の核となる可能性が示唆された。

一方、骨形成過程に並行して生体内に埋入されたOCPは多核巨細胞による吸収も受ける。それらは透過型電子顕微鏡で破骨細胞の超微形態的特徴である明帯様構造や波状縁様構造を有することや、それらとOCPとの界面は粗造であることから (49)、破骨細胞が骨組織を吸収するようにOCPは生体内で吸収性を示す材料と考えられる。加えて、OCPの骨再生能がHAや $\beta$ -TCPに比べて有意に促進され、吸収能力も有意に優れていること (50) やOCPとシグナル分子の一つである骨形成成長因子 (BMP-2) と複合化することで、より一層骨再生能が向上することが明らかになった (36, 51)。

### 1.3.2 オクタカルシウムフォスフェート・コラーゲン複合体 (Octacalcium phosphate・Collagen composites (OCP/Col))

合成OCPは優れた吸収性骨再生材料であるが、OCP単独での臨床応用を検討した際の問題点の一つは賦形成、操作性に難があることであった。つまり、OCPは結晶水を含む性質上、100℃を越えると脱水が始まり、200℃以上ではピロリン酸カルシウムなど、他の相への分解が進むため $\beta$ -TCPやHApのように焼結・成形することが困難である (36)。そこで



OCPと他の生体材料との複合化によってそれらの欠点を補うことが想起され、OCPとコラーゲンを複合化させた新たな骨再生材料 (OCP・コラーゲン複合体：以下 OCP/Col) が開発された (52)。

OCP/Col は豚皮膚由来のコラーゲン濃縮液にOCP顆粒を添加・混練の後、凍結乾燥し、減圧下で熱架橋 (150 °C , 24時間) し、成型製作することで、合成OCP単独での臨床応用における問題点である賦形性・操作性を改善した (52, 53)。ディスク状の OCP/Col では気孔率 92 % , 弾性率約 0.4 MPa であり、スポンジ状 (54, 55) を呈する。作製過程における減圧加熱操作などで OCP/Col は一部脱水、加水分解するものの、X線回折学的には基本的なOCPの構造を保持していた。また複合体作成過程のOCPの加水分解・再析出によって、OCP由来のカルシウムとリン酸による石灰化がコラーゲン上に創出され (56), *in vitro* では OCP/Col はOCP単独に比べ細胞接着性や増殖性を促進していた (51)。さらに ISO10993 に準拠して行った生物学的安全性試験 (細胞毒性試験, 復帰突然変異試験, 染色体異常試験, 皮膚感作試験, 急性全身毒性試験, 皮内反応試験) において問題を認めていない。

OCP/Col の非臨床試験として、ラット頭蓋冠骨欠損モデルを用いた骨再生能の研究での組織像ではそれらに対応して OCP/Col の網目に遊走した細胞がそれらを足場として定着し、骨芽細胞へと分化し骨基質を分泌する事で網目を埋め、さらに OCP/Col を吸収しながら、骨リモデリングを行っており、OCP/Col スポンジの網目構造を核とした骨再生を認めた。そして埋入 8 週では欠損内の新生骨の割合はOCP単独あるいはコラーゲン単独に比べて有意に骨形成を促進した (52)。

OCP/Col の骨再生能は様々な因子によって影響を受ける。例えば OCP/Col 作製時に熱架橋処理を行わない (未架橋) と生体内でコラーゲンの早期分解によって骨を形成すべき細胞の足場が消失する。そのため OCP/Col 未架橋群の骨再生能はOCP単独と同様なOCPのみを核とした骨形成に頼るため架橋群のそれを有意に下回る (56)。また、熱架橋処理温度も同様に骨再生に影響を及ぼし、真空下、150 °C, 24時間処理の骨再生能が 120 °C や 180 °C に比べて優れていた (57)。さらに OCP/Col の骨再生能が混和するOCP顆粒の大きさによって影響を受ける可能性が示唆されている (57, 58)。

一方、既に臨床応用されている骨補填材料である HA や  $\beta$ -TCP を基盤とした HAp・コラーゲン複合体 (HAp/Col) あるいは  $\beta$ -TCP・コラーゲン複合体 ( $\beta$ -TCP/Col) との骨再生能の比較を試みた。埋入12週の組織学的所見では OCP/Col では欠損内に新生骨が観察されるものの、それらは OCP/Col に比べて少なく、加えて  $\beta$ -TCP や HAp の明確な吸収傾向は認められず、組織定量的に OCP/Col の骨再生能は  $\beta$ -TCP/Col や HAp/Col を有意に上回っていた (59)。加えて、埋入 4 週という初期の段階での骨形成前駆体の分化や血管形成の促進について  $\beta$ -TCP/Col よりも優れていた (60)。

また、OCP/Col に間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells (MSCs)) を播種した試料 (OCP/Col-MSCs) と OCP/Col 単独に試料を骨欠損に埋入した場合の骨再生率の比較を試みられた。新生骨率は、埋入 4, 8 週共に、OCP/Col - MSCs の方が OCP/Col よりも高かった。また、埋入 4 週に比べて埋入 8 週は OCP/Col-MSCs と OCP/Col の新生骨率の差が小さくなった (61)。このことから、試料埋入初期の段階で MSCs が新生骨形成に影響を与えるが、長期間経過すると OCP/Col 単独でも OCP/Col - MSCs に近い新生骨が形成される可能性がある。

小動物を用いた骨再生能の検証後、臨床症例に即した大型動物（イヌ）の様々な骨欠損モデルを用いて OCP/Col の骨再生能を検証されてきた。ビーグル犬に対し自然治癒の困難な骨欠損を作製し、同部に OCP/Col を埋入し、対照群はコラーゲンディスクを埋入し、術後、3、6、12ヶ月間観察すると、組織学的には OCP/Col 群は各期間で欠損部内の新生骨の割合はコラーゲン群に比べて有意に多く、十分な骨再生を達成した (62)。さらに  $\beta$ -TCP 顆粒と同様な比較を行い、術後 6 ヶ月で OCP/Col 群の新生骨は  $\beta$ -TCP 群と比べて有意に多いこと、OCP/Col 由来の新生骨は既存骨と同様の結晶構造を示すのに対し、 $\beta$ -TCP 群ではそれら固有の構造が残存し、既存骨とは異なることが示された (63)。

また、ヒトの抜歯窩に OCP/Col を適用することを念頭に成犬に抜歯窩を作製し、同部に可及的に OCP/Col ディスクを埋入（対照群は抜歯後未処理）後、1、3ヶ月に標本摘出すると、X線所見では OCP/Col 埋入部の不透過性が経時的に亢進し、組織学的には OCP/Col を核として形成された新生骨が成熟骨に置換した。模型形態分析では対照群に比べ、抜歯後の歯槽形態が保たれ、抜歯窩での OCP/Col の優れた骨生成能や有用性が示唆された (64)。さらに自家骨移植が一般的の唇顎蓋裂児の顎裂部の治療を想定した顎裂モデルを用いて OCP/Col の骨再生能を検討している。同モデルに作製した骨欠損に OCP/Col を埋入し、術後 4、10ヶ月で検討すると、顎裂部は少量の埋入試料が封入されるものの、新生骨が顕著に増生され顎裂部は周囲の既存骨と骨架橋がなされ一体化していた。加えて、OCP/Col 由来骨は既存骨に類似した外側の皮質骨構造と密な骨梁を伴った内側の海綿骨構造を示していた。したがって、OCP/Col は旺盛な骨再生に加え、活発な骨改造を伴い、自家骨移植に代わる有用な骨代替材料となり得ることが示唆されている (65, 66)。

非臨床試験による OCP/Col の有用性データの蓄積を基に、抜歯窩、嚢胞腔を対象とした OCP/Col の安全性・有効性検証のために臨床研究が策定された。それらは東北大学歯学研究科研究倫理専門委員会での承認後、世界で初めてとなる OCP/Col の臨床研究 [WHO-ICTPR (World Health Organization-International Clinical Trials Registry Platform) JPRN-UMIN000004655] が、東北大学病院口腔外科で行われた。対象患者は文書より同意を得た20歳以上65歳未満の健全な男女、抜歯窩、嚢胞腔各 5 例、計10例に OCP/Col を埋入・閉鎖創とし、術後 1 年経過時まで定期的に臨床所見、血液・尿検査、X線学的検査が行われている。術後 1 年にわたる経過観察を経て、全ての患者は無事に試験を終了した。術後経過は安定しており、重大な副作用や重篤な検査値の異常は認められなかった。OCP/Col を核としているような所見を得 (67)、また、長径約 40 mm の比較的大きな骨欠損でも修復を認めている (68)。医師主導の臨床研究で安全性・有効性を確認した後 (68)、企業主導治験 (WHO-ICTPR JPRN-UMIN 000018192) が行われた。治験終了後、製造販売承認申請が行われ、2019年に商品化された（商品名：コラーゲン使用人工骨「ボナーク®」(Bonarc®)）。

## 1.4 骨造成法

抜歯後に骨吸収により、歯槽骨が吸収し (69)、歯槽骨の縮小は、インプラントの支持不良や審美性の低下を招く (70)。そのため、従来から歯槽骨造成が臨床において行われていた。スペースメーカーとしての吸収性・非吸収性メンブレンを利用した GTR (guided tissue regeneration)・GBR (guided bone regeneration)、BMP などシグナル分子やハイドロキシアパタイト hydroxyapatite (HAp) 及びリン酸三カルシウム tricalcium phosphate (TCP) など人工骨の移植が臨床の現場で使用されている (71)。

### 1.4.1 GTR, GBR, 仮骨延長法による骨造成法

1988年に歯周組織の再生法としてGTRが開発された(72)。GTRは、歯周病に罹患した組織を除去した際のスペースへの線維性組織の侵入を防止するために遮断膜(Membrane)を挿入し、確保したスペースに新生骨を再生させる骨再生法である。その後、GTRから発展した GBR が報告されている (73)。GBR は、抜歯時に炎症等で歯槽骨が痩せ細りインプラントができない場合に、GTRと同様にインプラント挿入を想定して歯槽骨の周囲にスペースを作り、その後に Membrane を挿入することで線維性組織の侵入を防止し、確保したスペースに骨補填材を入れて歯槽骨を増量させる骨造成法である。GBR による骨造成は臨床的に有効であるが、治療の成否が術者の手技に影響され、決して簡便な方法ではない。1960年代に確立された仮骨延長法は、骨を切り離し、残存した骨と切り離した骨の間に新生骨を作る骨造成法であり、骨組織が本来持っている治療能力を骨増量に利用した方法である (74)。現在では仮骨延長法を用いて、無歯顎堤を垂直方向あるいは水平方向へ増大させることが可能となっている。それらはインプラント埋入予定部位への骨造成法として有効であるが、特殊な機器を口腔内に装着する必要があるため、決して簡便な方法ではない。

### 1.4.2 シグナル分子による骨造成法

1997年には、シグナル分子のBMP-2あるいはBMP-7を用いた骨造成が報告された (75)。米国においてすでに整形外科及び歯科での適用が承認されている。しかしながら、使用された薬物担体が BMP の放出を制御できないために多量の BMP を使用せざるを得なかった。そのためコストが高くなってしまったためでなく、予定外の部位に過剰に骨を形成し、思わぬ合併症を引き起こしてしまうといった問題が生じた。さらには、移植部周囲に炎症を引き起こしたり、移植部周囲の骨組織の吸収を促進してしまったりといった合併症や、腫瘍形成を誘導する可能性なども指摘され、BMP を取り巻く状況には厳しいものがある (76)。1998年には患者の血液から種々の増殖因子を豊富に含む血小板を濃縮した多血小板血漿(Platelet-rich plasma: PRP)を用いた骨造成が報告された (77)。PRPを骨造成に使用した場合と未使用で骨造成を行った場合を比較して、骨造成効果に差が見られないとの報告がある。PRP単独では骨造成のためのスペースの確保が困難なため、自家骨やリン酸カルシウム系の骨補填材と混合して使用されている。

#### 1.4.3 人工骨による骨造成法

その他の方法として、縮小部位に自家骨や人工骨などを埋入する骨造成処置が行われている(78)。自家骨移植は、採骨のために外科的侵襲の無用な部位にメスを加えることや採骨部疼痛のような採取に伴う合併症など患者にとって大きな負担を強いる(79)。そのため、人工骨を用いた骨造成が報告されている(図3, 表5)。

垂直的骨造成のモデルは、小動物を用いた場合、基本的には試料を骨膜と既存骨との間に埋入している。また、試料を固定するために既存骨に孔や溝を形成することや、金属やプラスチック製のドームで上側面を覆うモデルがある(図3, 表5)。試料は、リン酸カルシウム系材料のみ(80)、生体吸収性高分子とリン酸カルシウム系材料との組合せ(81, 82)、自家骨とリン酸系カルシウムとの組合せ(83)、シグナル分子とリン酸カルシウム系材料との組合せ(84)及び、細胞とリン酸カルシウム系材料との組合せ(85)が報告されている。

しかし、これまで紹介した人工骨はいずれの試験においても、新生骨に置換されない(新生骨ができない)、形状維持ができない等で、有効な垂直的骨造成は確認できていない場合が多い(ある程度新生骨が形成している場合も、試料の形状が小さく、さらに既存骨に貫通孔を形成し、人工骨の上側面を他材料で被覆しているため、新生骨がしやすい環境において形成されている。)

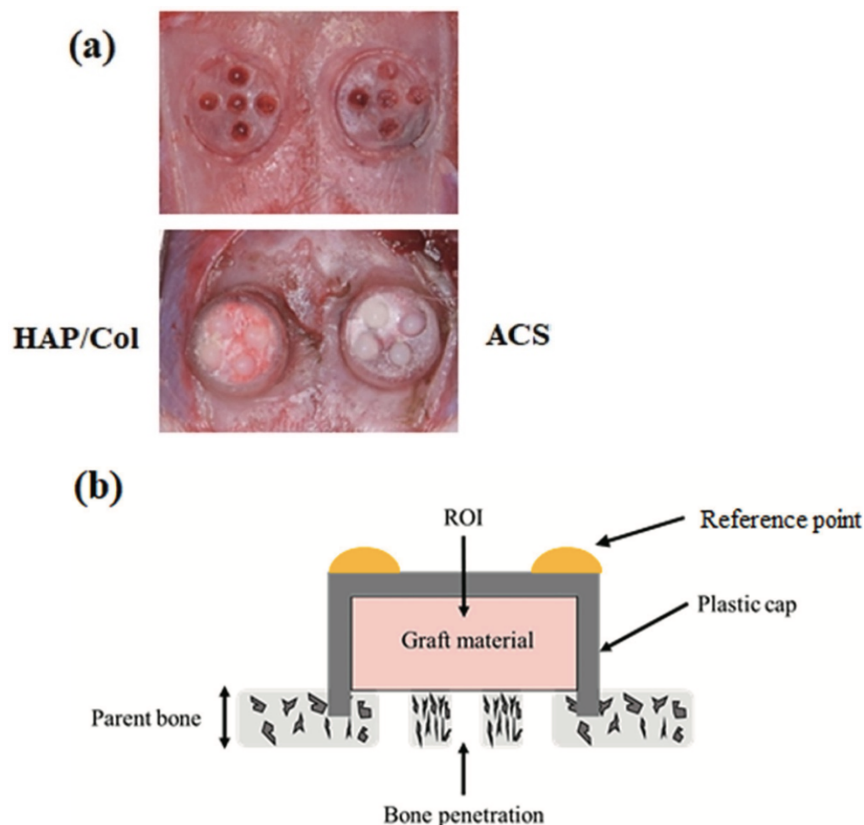


図3:実験モデル(例)(81)

(a) 上段：試料固定用の溝と貫通孔が形成されたラットの頭蓋骨

下段：孔にセットされた実験用試料 (HAp/Col) と比較用試料 (ACS)

(ACS: Absorbable Collagen sponge)

(b) 断面図 (ROI: Regions of interest, Parent bone: 既存骨, Bone penetration: 貫通孔)

表5:垂直的骨造成のサンプルと実験モデル (80-85)

No	種類	サンプル			上側面 被覆	溝形成 (既存骨)	孔形成 (既存骨)	Control	動物	文献番号
		材料	高さ (mm)	直径 (mm)						
1	リン酸カルシウム系材料	HAp, $\beta$ -TCP	2.0	5.0	—	—	—	—	ラット	80
2	生分解吸収性高分子 + リン酸カルシウム系材料	Collagen+HAp	—	5.0	プラスチック キャップ	有り	有り	Collagen	ラット	81
		ポリ乳酸+Collagen +HAp	2.0	8.0	—	—	有り	ポリ乳酸+HAp	家兎	82
3	自家骨 + リン酸カルシウム系材料	自家骨+HAp	0.9~2.0	5.0	プラスチック キャップ	有り	有り	自家骨	ラット	83
4	シグナル分子 + リン酸カルシウム系材料	BMP-2 + HApと $\beta$ -TCP混合	3.0	8.0	—	—	有り	HApと $\beta$ -TCP 混合	ラット	84
5	細胞 + リン酸カルシウム系材料	細胞 + $\beta$ -TCP	5.0	7.0	金ドーム	有り	—	$\beta$ -TCP	ラット	85

#### 1.4.4 OCP/Col を用いた垂直的骨造成 (図4)

開発当初の OCP/Col 単独を用いて垂直的骨造成について検討が行われた。実験モデルは、OCP/Col をラットの頭蓋骨上で骨膜下に埋入している。本研究でもこの実験モデルを用いている。このモデルは、臨床において多用されており、OCP/Col を骨膜と既存骨の間に埋入することにより、骨膜及び既存骨側からの骨再生が促進する可能性があること、既存骨に孔等を作らないので低侵襲であり、既存骨からの骨髓液の影響が少ないため、OCP/Col の骨再生能が最もよく反映される。

試料は、高さ 3 mm と 1 mm (両試料ともに直径 9 mm) の 2 つを用い比較している。高さ 3 mm の試料は、皮膚側からの静的な圧力が高くなり、強い酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP) 陽性となり多核巨細胞の発生数が多く、4 週、12 週と時間の経過とともに高さの低下と試料の吸収が進んだ。一方、高さ 1 mm の試料は皮膚側からの静的な圧力が低く、弱い TRAP 陽性反応であったために多核巨細胞の数が少なく、3 mm と比べる時間が経過しても高さの低下と試料の吸収が限定的であった。したがって、開発当初の OCP/Col は、外力の影響による試料の変形と、多核巨細胞による試料の吸収により、垂直的骨造成は実現できていない(55)。

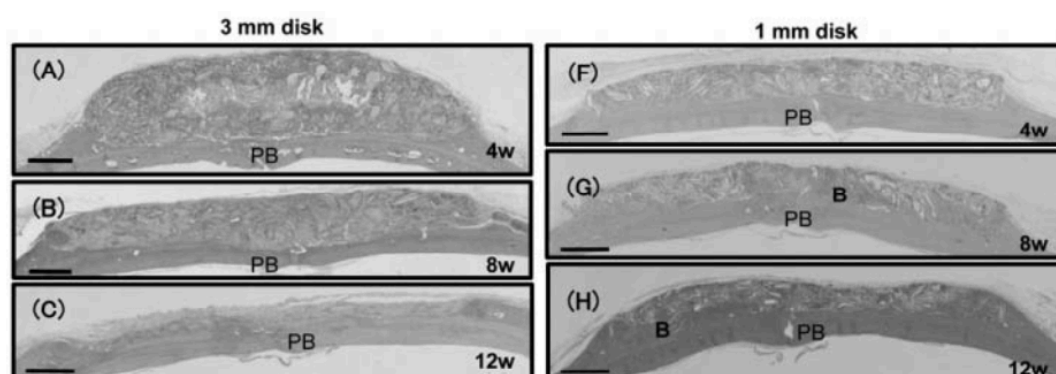


図 4-1: 厚さ 3 mm の OCP/Col の組織図 (55)

経時的に試料が吸収される。バー: 1 mm, PB: 既存骨, B: 新生骨,  
\*: OCP

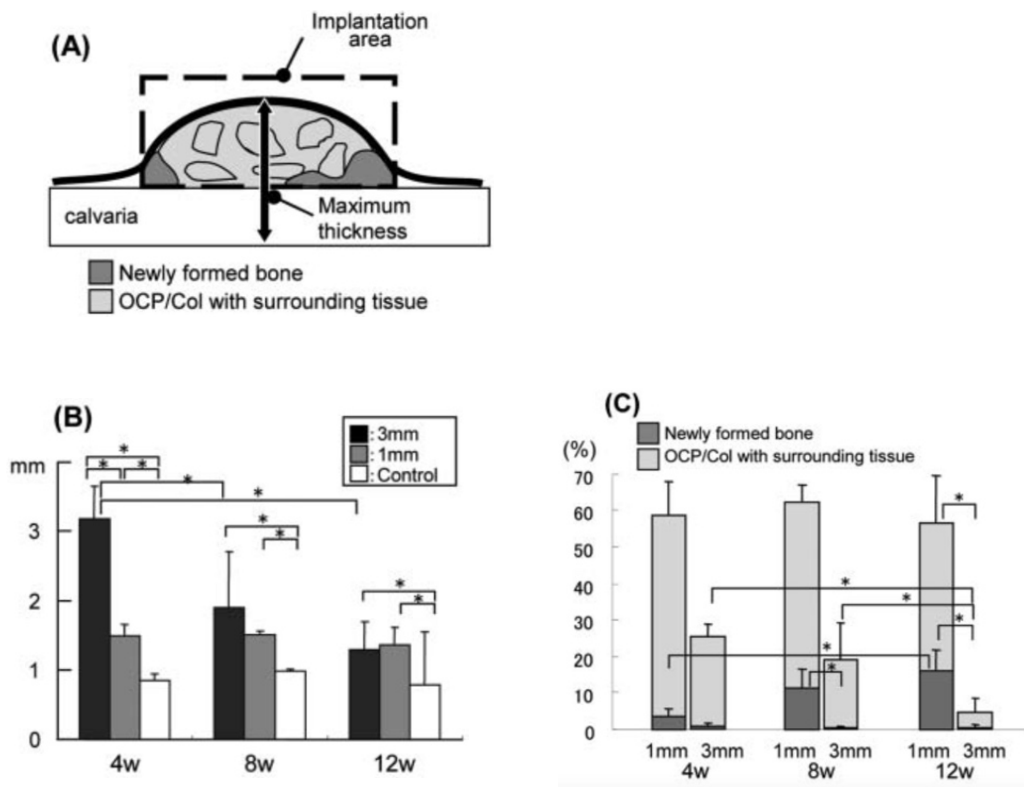


図4-2: 定量解析 (55)

(A) 概略図, (B) 新生骨率 ( 4, 8 及び12週, Control: 頭蓋冠 ),  
(C) 新生骨率と OCP/Col 及び周囲の細胞

## 1.5 本研究の目的

再生医療に使用する OCP/Col は、口腔外科分野の骨欠損領域を対象として開発され、既存の人工骨に比べて骨再生能や賦形成、操作性に優れており、骨欠損の分野において医療機器として現状の骨再生治療に大きな貢献をもたらすと考える。一方、歯科領域において、抜歯後に骨吸収により歯槽骨が縮小するため GBR 法等の骨造成処置が行われているが、歯槽骨の局所的な欠損を修復する治療に留まり、歯槽骨全体を造成する処置は行われていない。そのため、歯槽骨に垂直に骨を造成（垂直的骨造成）するために自家骨や人工骨を用いることが検討されているが、自家骨移植は侵襲が高い等の問題があり、人工骨は形状保持や新生骨形成の点で臨床において使用できる有望なものは現時点では存在しない。また、開発当初の OCP/Col を単独で用いた場合、骨膜側から外力による試料の変形や、負荷が大きい場合には OCP/Col が破骨細胞類似の多核巨細胞により吸収されたため、垂直的骨造成は実現できていなかった (55)。

本研究では、OCP/Col の周囲を Polytetrafluoroethylene (PTFE) で囲み、外力を緩和することで骨再生能が向上することが報告されている (66) ことを参考として、生分解吸収性材料であるポリ乳酸 (PLA) ケージを OCP/Col に被覆し、OCP/Col にシグナル分子である TPTD（副甲状腺ホルモン (PTH) のアミノ配列を生物学的に活性するように人工合成したペプチド・テリパラチド）を滴下したものを試料としてラット頭蓋冠上の骨膜下に埋入し、垂直的骨造成が可能かどうかを検討した。併せて、骨膜が骨造成に寄与することが報告されている (86) ことから、PLA ケージの形状の違いからその関連性の有無について検討を加えた（第 2 章）。

一方、第 2 章のように OCP/Col と人工材料を併用する場合、PTFE などの非吸収性材料やポリ乳酸 (PLA) などの吸収性材料の中で骨への置換に長期間要する材料であると摘出のための再手術が必要となり患者への侵襲性が高くなるといった課題がある。本研究では前述の課題を考慮し、垂直的骨造成の実現のため OCP/Col 単独で形状保持と新生骨形成との促進を図ることを目的として試料の製造条件を変更し、形状維持や新生骨形成が促進されるかについて検討した（第 3 章）。

総括として、第 2 章及び第 3 章についてまとめ、加えて将来展望について検討した（第 4 章）。

## 第2章    **PLA**で被覆したオクタカルシウム           フォスフェート・コラーゲン複合体           (**OCP/Col**)の垂直的骨造成



## 2.1 緒言

自家骨に代わる人工材料の一つである OCP/Col は骨欠損に関して、他の人工骨(HAp/Col や  $\beta$ -TCP/Col) よりも骨再生能が優れており (59) , さらに、骨前駆細胞の分化と血管形成を促進することが報告されている (60) 。既存の人工骨又は人工骨と細胞、シグナル分子の組み合わせた試料について有効な垂直的骨造成は達成できていない。しかし、開発当初の OCP/Col 単独を用いた報告においても、外力の影響による試料の変形と、多核巨細胞による試料の吸収により、垂直的骨造成は実現できていない (55) 。

垂直的骨造成を達成するためには、形状保持と新生骨形成を促進することが必要であるが関連する事項について過去に報告されている。形状保持では、Polytetrafluoroethylene (PTFE) リングで OCP/Col を被覆すると有効であることが報告されている (66) 。また、新生骨形成の促進については、OCP/Col にシグナル分子である TPTD (副甲状腺ホルモン (PTH) のアミノ配列を生物学的に活性するように人工合成したペプチド・テリパラチド (後述)) を滴下することで OCP/Col 単独に比べて新生骨が増加すること (87) や、骨膜が新生骨形成に及ぼす影響についても報告されている (41) 。

### 2.1.1 PTFEの被覆によるOCP/Colの形状保持と新生骨形成 (図5)

過去の報告より OCP/Col 単独では高さが 3 mm の場合には形状保持ができなかった (55) のに対して、Polytetrafluoroethylene (PTFE) リングにより、高さ 1 mm と 3 mm の OCP/Col ディスク及びコラーゲン (Col) ディスクの側面を被覆した試料と PTFE 単独の試料 (OCP/Col/PTFE , Col/PTFE 及び PTFE) ラットの頭蓋骨上の骨膜下に埋入して、4 , 8 及び12週後の新生骨形成について検討を行なっている。4 , 8 及び12週で、高さ 3 mm の OCP/Col/PTFE の形状は、上面が変形した試料はあったものの、その他の部分の形状は保持され、新生骨率も Col/PTFE 及び PTFE よりも高かった。この結果から、OCP/Col の側面を PTFE リングで被覆することにより、外力が緩和し、OCP/Col の形状をある程度保持し、骨再生能が向上した (54) 。

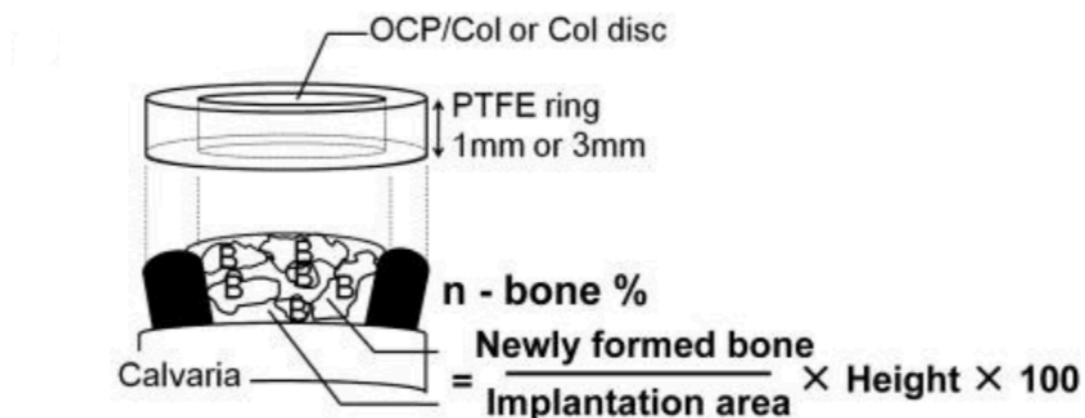


図 5-1: 定量解析 (54)

試料の概略図(OCP/Colの外周を PTFE リングで被覆)と新生骨率

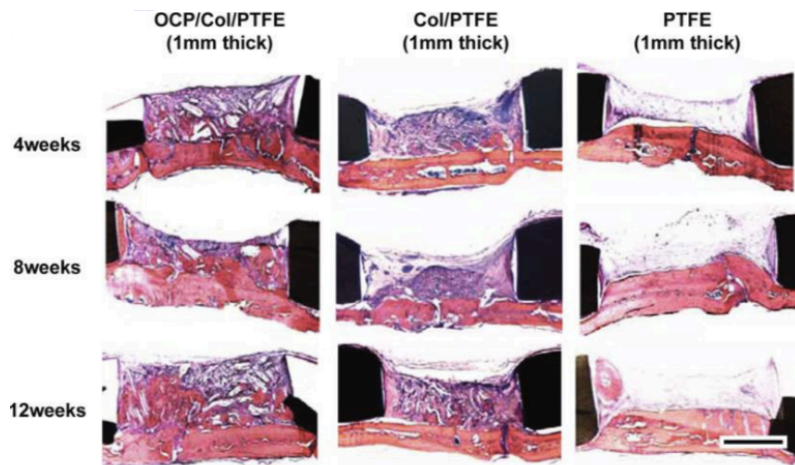


図 5-2: 厚さ 1 mm の組織写真 (54)  
埋入後 4, 8 及び 12 週 OCP/Col/PTFE, Col/PTFE 及び PTFE の全体像,  
バー : 1 mm

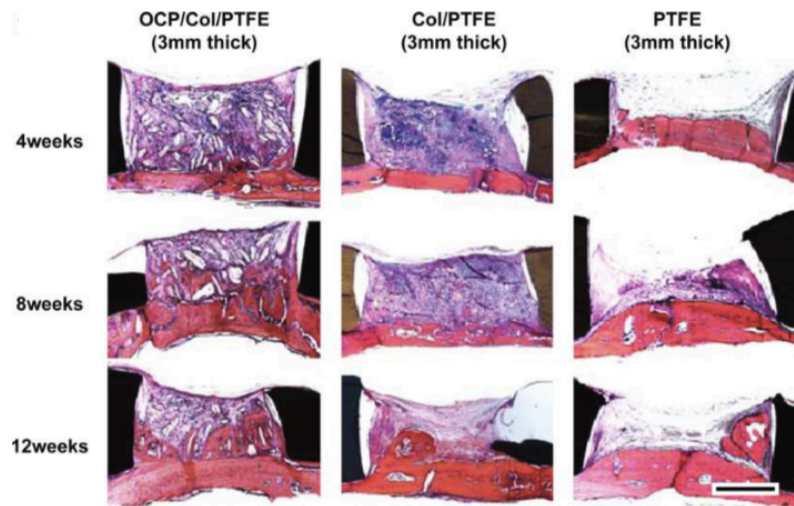


図 5-3: 厚さ 3 mm の組織写真 (54)  
埋入後 4, 8 及び 12 週 OCP/Col/PTFE, Col/PTFE 及び PTFE の全体像,  
バー : 1 mm

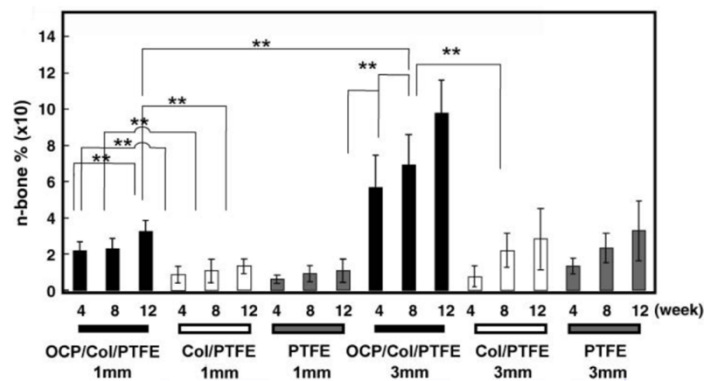


図 5-4: 4, 8 及び 12 週における高さ 1 mm と 3 mm の OCP/Col/PTFE, Col/PTFE 及び PTFE の新生骨率 (54)

### 2.1.2 TPTD 滴下による OCP/Col の骨再生向上

OCP と骨形成タンパク質 (BMP-2) と組み合わせが、OCP 単独よりも骨再生を相乗的に増強したことが報告されている (51)。また、ラット血清中に浸漬した OCP には骨形成関連タンパク質が吸着することが明らかになっており (88)、これらの知見から、OCP/Col においても骨形成関連タンパク質を吸着することが考えられる。また、OCP/Col を骨欠損部に埋入する際に、それらに TPTD を滴下することにより、骨再生能が向上することが報告されている (87)。TPTD の投与により骨形成および骨のリモデリングを促進 (87) させるため、TPTD 溶液が滴下された OCP/Col は、OCP/Col 自体の骨再生特性に加えて、TPTD の骨再生能力をさらに引き出し、優れた骨再生を促進させると考えられる。なお、過去の報告から、OCP/Col に 1.0  $\mu\text{g}$  の TPTD を添加した試料からの TPTD の徐放率について、1 日で約 40 % 徐放し、28 日で 46 ~ 49 % 徐放している (図 6)。この結果から時間が経過しても添加した TPTD の約 50 % は試料に保持していると考えられる (89)。

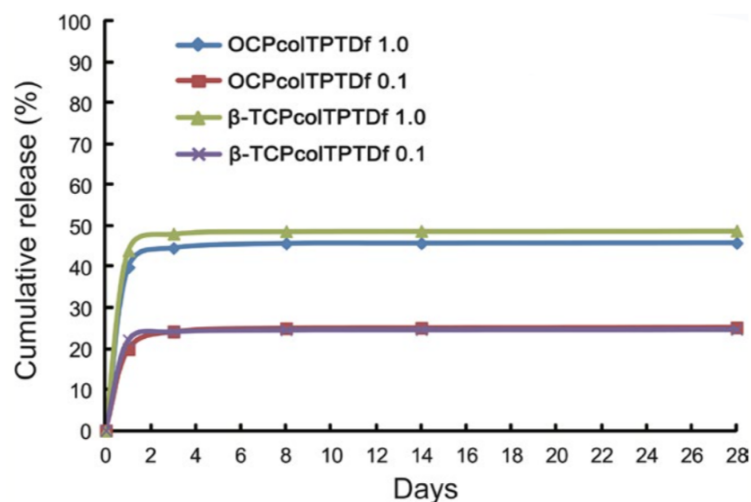


図 6: OCP/Col 又は  $\beta$ -TCP/Col からの TPTD の徐放率と期間 (90)

OCP/Col 及び  $\beta$ -TCP/Col に TPTD を 1.0  $\mu\text{g}$  添加した試料 (OCPcolTPTDf1.0 ,  $\beta$ -TCP/Colf1.0) と OCP/Col 及び  $\beta$ -TCP/Col に TPTD を 0.1  $\mu\text{g}$  添加した試料 (OCPcolTPTDf0.1 ,  $\beta$ -TCP/Colf0.1) の TPTD の徐放率と期間を計測した。

OCPcolTPTDf1.0 と  $\beta$ -TCP/Colf1.0 は、試料埋入 1 日で TPTD は約 40 % 徐放し、28 日で 46 % ~ 49 % 徐放した。一方、OCPcolTPTDf0.1 と  $\beta$ -TCP/Colf0.1 は、試料埋入 1 日で TPTD は約 20 % 徐放し、28 日で 24 % ~ 25 % 徐放した。

### 2.1.3 骨膜の新生骨形成への影響 (図7)

過去の報告では骨膜が骨形成に寄与すること (86) や骨膜をシート状に培養し、これをそのまま骨膜として歯周病による歯槽骨欠損の再生に応用する試みがなされており、ヒトへの臨床研究では良好な結果が報告されている (8)。しかし、OCPと骨膜の関係に関して、異なった結果が報告されている (41)。OCP顆粒をラットの頭蓋骨上の骨膜下に埋入する際に、OCPと既存骨のみが接している場合 (OCP と骨膜とはフィルターで遮断：図7(a))は新生骨が形成された。一方、OCPと骨膜のみが接している場合 (OCP と既存骨とはフィルターで遮断：図 7(b)) には、新生骨が形成されなかった。従って、OCPによる骨再生に関しては、必ずしも骨膜が影響を与えるとは言えないと考えられる。

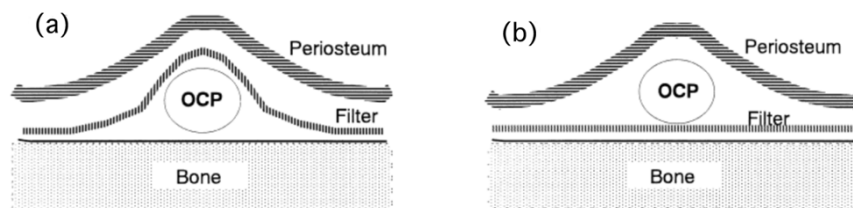


図 7: ラットの頭蓋骨上の骨膜下に埋入されたOCP顆粒 (41)

- (a) OCP と骨膜との間にセルロース性のフィルターが挿入され、OCPと既存骨のみが接している。
- (b) OCP と既存骨との間にセルロース性のフィルターが挿入され、OCPと骨膜のみが接している。

### 2.1.4 本章の目的

OCP/Colの側面をPTFEで被覆すると形状保持と新生骨形成ができたが、試料によっては上面に変形が生じていること、PTFEが生体非吸収性合成高分子材料であるため摘出する必要があるという2つの問題点がある。このため、本研究では、生体非吸収性のPTFEの代替として外力を緩和するために生体親和性が高いポリ乳酸(PLA)ケージを用いてOCP/Colを被覆した。PLAは縫合糸などで幅広く医療に用いられている。また、TPTDは骨粗鬆症の治療用として医療に用いられており、OCP/Colに滴下すると骨再生能を向上させる。

以上より本研究ではOCP/Colに新生骨形成促進のためにTPTDを滴下したものに、外力を緩和するためにPLAケージで被覆した試料を、ラット頭蓋冠上の骨膜下に埋入し、垂直的骨造成が可能かどうかを検討した。併せて、PLAケージの形状の違いから骨膜と新生骨形成の関連性の有無について検討を加えた。

## 2.2 実験方法

### 2.2.1 オクタカルシウムフォスフェート・コラーゲンの作製方法

OCP/Col（多孔質複合体）の合成は直接沈殿法 (39) により合成した。合成方法は下記の手順により実施した。OCP調整用の1液および2液を次の通り調整した。

〔1液〕リン酸二水素ナトリウム二水和物 31.2 g を蒸留水 2500 g に溶解後 1 液を調整した。

〔2液〕酢酸カルシウム一水和物 35.2 g を蒸留水 2500 g に溶解し，2 液を調製した。

次に，1 液をセパラブルフラスコに入れ，マントルヒーターにて 70 °C に昇温した。次に攪拌機 (MAZELAZ, 東京理科器械社製) に攪拌翼（羽径 12 cm）を取り付け，250 rpm の速度で攪拌しながら，1 液に対して 2 液を約 28 mL/min の速度で滴下した。滴下終了後，1 液と 2 液の混合液を 70 °C ，250 rpm でさらに 2 時間攪拌した。次に，上記混合液中に生成した沈殿物をメンブレンフィルター（孔径 3 μm, A300A293C, アドバンテック東洋社製）を用いてろ過し，回収した。回収した沈殿物を蒸留水 1500 mL に分散させ，15 分間攪拌し洗浄した。同様のろ過，洗浄の工程をさらに 3 回繰り返した。次に，洗浄後の沈殿物を，恒温乾燥機を用いて 30 °C で 24 時間乾燥した。乾燥後の沈殿物を電動ミルにて粉碎した後，ふるいを用いて粒径を 300 ～ 500 μm に分級し，粉体を得た。最後に，得られた粉体に対して 120 °C で 2 時間の乾熱滅菌を行った。ブタ皮膚由来コラーゲン (NMP コラーゲン PS ，日本ハム社製) の約 0.5 重量% のコラーゲン溶液に水酸化ナトリウム水溶液を加えたコラーゲン懸濁液に OCP（粒径 300 ～ 500 μm ）を OCP とコラーゲンが重量比で 77 : 23 となるように OCP/Col 懸濁液を得た。次に，得られた OCP/Col 懸濁液中のコラーゲンが 3 重量% となるように OCP/Col 複合ゲルを得た後に脱泡及び凍結乾燥して成形した。次いで，これを減圧下，150 °C で 24 時間加熱し熱脱水架橋を行った後，メスで厚さ 1.5 mm にカットし，直径 9 mm × 厚さ 1.5 mm のディスクを作成した（図 8）。このディスクを動物埋植用として電子線照射したものを使用した。

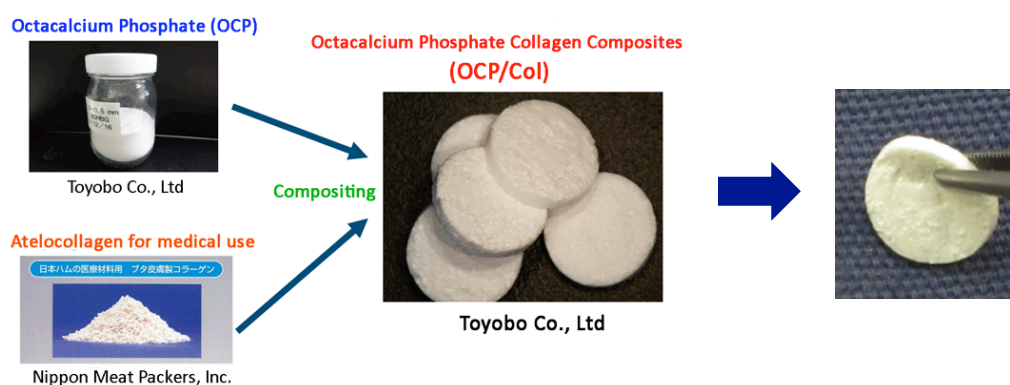


図 8： 作製した OCP/Col

OCPとブタ皮膚由来コラーゲン (NMP コラーゲン PS ，日本ハム社製) から OCP/Col を作製した。賦形成・操作性に優れる。

### 2.2.2 ポリ乳酸 (PLA) ケージ

3D プリンター(MakerBot replicator desktop 3D printer, MakerBot Industries, NY)により作製した。PLA ケージは次のように形成される。ケージのデザインファイルを，3D プリンター専用ソフトによって，3D プリンターで利用できるデータファイルに変換し，このファイルを 3D プリンターに転送し，PLA フィラメントを溶かし，ケージを成形する。

外観は外径 10 mm，内径 8.5 mm，高さ 2.5 mm であり，OCP/Col ディスクの上面及び側面を被覆する。種類は，上面が，孔の形成の無いグループ(N-group: N群)，大きい孔（直径 6 mm）が形成されたグループ(B-group: B群)及び小さい孔（直径 1 mm）が 7 つ形成されたグループ(S-group: S群)の 3 種類とした（図9）。ケージに孔が形成されていると，皮膚側から細胞の侵入すること，骨膜と OCP/Col との接触することが考えられる。これらは 3 種類のケージにより異なり，ケージの孔形成の有無や孔の形状（大小，数）と新生骨形成についての関係を検討する。

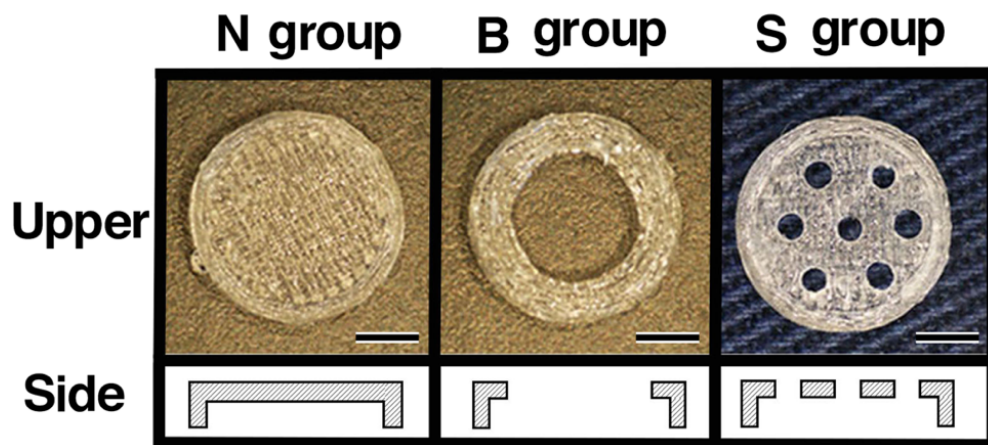


図9: N, B, S群のPLAケージ：外観は外径 10 mm, 内径 8.5 mm, 高さ 2.5 mm。

上面が，孔の形成の無いグループ (N - group)，大きい孔（直径 6 mm）が形成されたグループ (B - group) 及び小さい孔（直径 1 mm）が 7 つ形成されたグループ (S-group)。

バー：3 mm

(Yanagisawa T, et al, Clin Exp Dent Res 2020 より引用)



### 2.2.3 テリパラチド酢酸塩

骨修復の三要素として、「細胞」、「シグナル分子」、「足場」の3つが必要となる。OCP/Col 単独による骨再生能には限界があり、例えば、悪性腫瘍等による下顎骨区域切除などの難症例に対して十分な有効性を示せる可能性は少ないと考えられるため、「シグナル分子」の複合化が重要と考えた。「シグナル分子」については近年に盛んに研究や実用化がされており日本国内で既に医薬品として承認され人体に使用実績があり有効性と安全性が判明している物質もある。代表的な「シグナル分子」としては、骨形成タンパク質 (BMP) と線維芽細胞成長因子 -2 (Fibroblast Growth Factor-2: FGF-2 (塩基性 FGF, BasicFGF)) がある。BMP を強力な骨誘導能を有する増殖因子である反面、併用する場合は移植部周囲の骨組織の吸収を促進してしまうといった合併症及び腫瘍形成を誘導する可能性も指摘されている (76)。FGF-2 は、骨芽細胞や繊維芽細胞を含む多くの細胞の分化、増殖に作用する生理活性タンパク質であり、ナノグラムオーダーの極微量でも骨再生を促進することが動物実験により確認されている (91)。近年では歯周組織再生剤として「リグロス」(科研製薬株式会社) が医薬品として承認されている。

一方、本研究では古くから実用化を目指した様々な研究が行われ、現在は盛んに臨床応用がなされている副甲状腺ホルモン (Parathyroid hormone : PTH) に着目した。PTH は両生類以上の脊椎動物に認められ、細胞外液中のカルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 濃度の恒常性を維持するうえでもっとも重要なホルモンである。分子構造としては、糖鎖をもたない 84 個のアミノ酸からなるペプチドホルモンであるが、生物学的に活性をもつのは N 末端領域の 1-34 の部位である。したがって前記 1-34 のアミノ酸を配列させた人工合成ペプチドであるテリパラチド (Teriparatide: TPTD) が研究されるようになった (92)。TPTD は骨において独特の作用メカニズムを有し、それらの連続投与は骨量を低下させるが、断続的投与は骨梁骨量の増加を生じる (93, 94)。そして、TPTD は間歇的皮下投与をすることで、骨粗鬆症の治療のために米国 FDA によって承認された治療薬となっている (92)。そこで多くの研究者が TPTD の間歇的皮下投与と併用して実験的に骨欠損を修復しようと試みてきた (95-99)。具体的には吸収性コラーゲンスポンジ (98)、脱灰骨基質 (96, 98)、 $\beta$ -TCP (99)、あるいは PLA などの材料と TPTD を組み合わせることで骨再生を促進することが試みられてきたが、骨再生のための TPTD の最適な投与期間と投与量はまだ確立されていない (100)。しかし、OCP/Col 埋入直後に TPTD 溶液を摘出し OCP/Col の持つ再生能と TPTD の局所作用を併用することによって骨再生能が増強させることが確認されている (87)。

本研究では、凍結乾燥された TPTD (テリボン皮下注射用 56.5  $\mu\text{g}$  (旭化成フォーマ株式会社)) を 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度になるように生理食塩水で調整した。生理食塩水で希釈して TPTD 溶液 (1.0  $\mu\text{g}/0.1\text{mL}$ ) を得た。調整した各 TPTD 溶液は使用直前まで冷凍庫 (-20  $^{\circ}\text{C}$ ) に保存した。

#### 2.2.4 ラットへの移植方法

ラットへの移植については、12週齢の Wistar 系雄性ラット（日本SLC株式会社，静岡県浜松市）を用い，国内及び国際法の動物実験倫理指針を順守し，東北大学動物研究委員会（2014-Biomedical Engineering Animal-001）の承認を受け実施した。実験動物は，腹腔内メデトミジン塩酸塩(Domitor，日本製薬工業（株），郡山，福島）(0.05 mg/kg)，ミダゾラム(Dormicum：アステラス製薬株式会社，東京，日本）(0.12 mg/kg) およびブトルファノール酒石酸塩(Vetorphale:明治製菓ファルマ株式会社，東京，日本）(0.15 mg/kg) を腹腔内に投与した。麻酔後，ラット頭蓋冠に皮膚切開・骨膜切開を加え頭蓋冠を明示した。PLA ケージ内に OCP/Col を填入し，さらに TPTD 溶液 1.0  $\mu\text{g}$  を OCP/Col に滴下した埋植試料を，PLA ケージに被覆されていない OCP/Col ディスクの下面が頭蓋冠の骨面と接触するように骨膜下に設置した（図 10）。埋入後，骨膜および皮膚縫合を行い，手術を終了した。N 群（孔無），B 群（大孔形成）及び S 群（小孔複数形成）各々について 5 匹ずつを用い，観察期間は最大12週時とした。

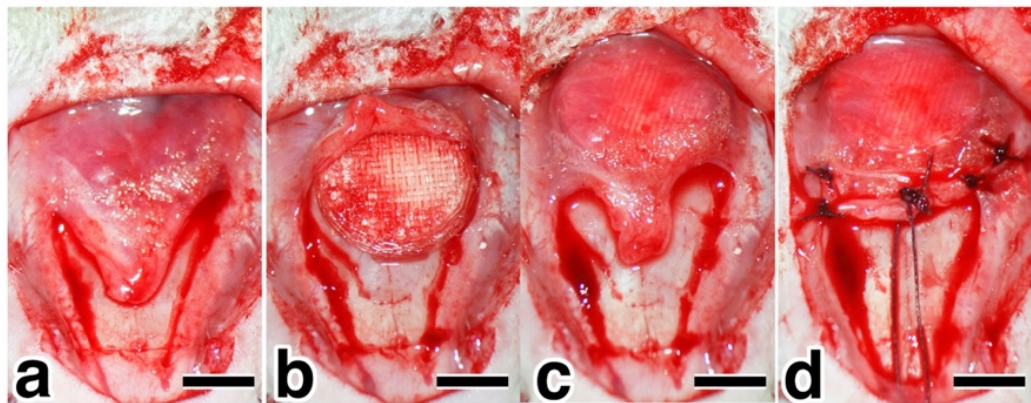


図 10: 試料埋入図

頭蓋骨の骨膜を剥離 (a) した後，PLA ケージ内に OCP/Col を填入し，さらに TPTD 溶液 1.0  $\mu\text{g}$  を OCP/Col に滴下した埋植試料を，PLA ケージに被覆されていない OCP/Col ディスクの下面が頭蓋冠の骨面と接触するように骨膜下に挿入し (b)，埋入した後骨膜で再び埋植する (c)。埋植後，剥離した骨膜を復位し縫合する。

バー：3 mm

(Yanagisawa T, et al, Clin Exp Dent Res 2020 より引用)



### 2.2.5 マイクロ CT 撮影方法

マイクロ CT (Latheta LCT-200, 日立アロカメディカル, 東京, 日本) を用いて, 試料埋入後4, 12週時の放射線不透過性を調べた (図 11)。撮影中の実験動物による過度の動きを制限するため, ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg) を腹腔内注射した。画像は, スライス厚 120  $\mu\text{m}$ , 画素 60  $\mu\text{m}$ , 管電圧50 kVp, 管電流500  $\mu\text{A}$ にて撮影した。埋入後12週時は, 撮影後, 実験動物は過量のペントバルビタールナトリウムを腹腔内注射し安楽死させた。その後, 頭蓋冠および周囲組織を切除し 0.1M リン酸緩衝・4 %パラホルムアルデヒド (pH7.4) で固定した。

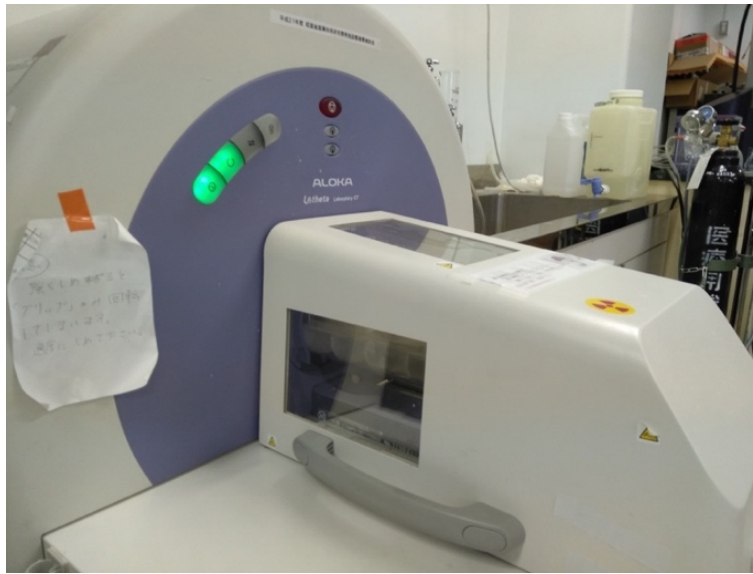


図 11: マイクロCT (Latheta LCT-200, 日立アロカメディカル, 東京, 日本)

### 2.2.6 病理組織標本の作成及び組織形態計測

4  $^{\circ}\text{C}$  で 0.01M リン酸緩衝・10 %EDTA (pH7.4) 液中で脱灰した。その後, 脱灰された標本をパラフィン包埋し, ミクロトームを用いて試料の中心部を前頭断にて約 6  $\mu\text{m}$  厚に薄切した。そして各パラフィン標本につき 6 枚の切片をヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) し, 光学顕微鏡 (Leica DM2500, Leica Microsystems Japan, Tokyo, Japan) を用いて観察し, 試料埋入後の組織学的変化について観察した。

### 2.2.7 組織定量学的解析

HE 染色された切片を用いて埋入した試料を 4 領域 (① 上側辺縁部 (UM), ②下側辺縁部 (LM), ③上側中央部 (UC), ④下側中央部 (LC)) に等分割した (図 12a, 12b)。画像ソフト (ImageJ: National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて, PLA ケージで囲われた部分及び新生骨を二値化 (図 12c, 12d) し, 全体及び各領域の面積を 100 %とした場合の新生骨の占める割合 (n-Bone%) を算出した (詳細は 2.6 に記載)。

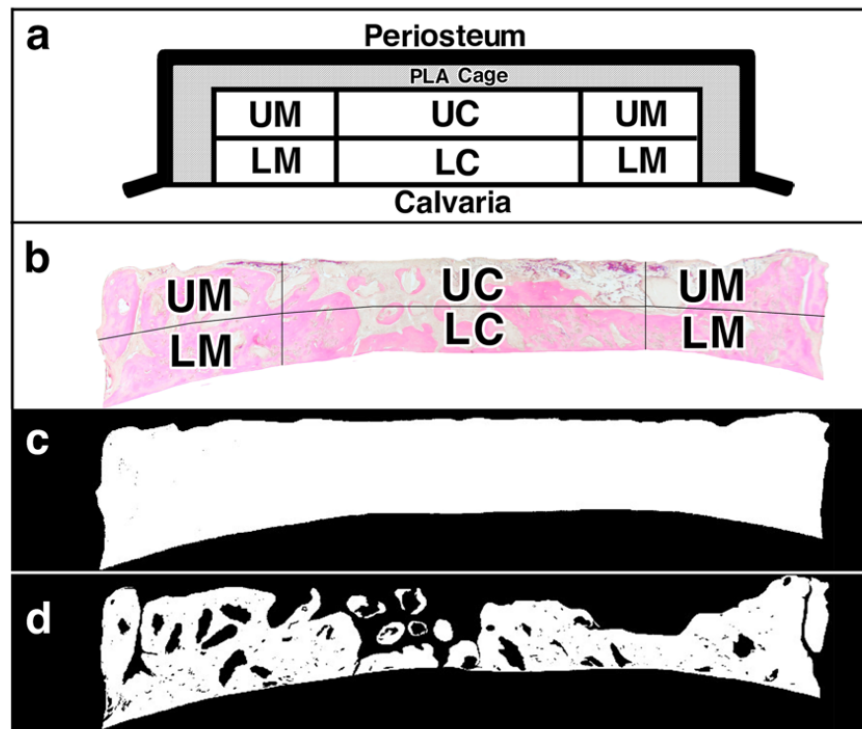


図 12: 組織定量的解析

HE 染色された切片を用いて埋入した試料を 4 領域（①上側辺縁部 (UM)，②下側辺縁部 (LM)，③上側中央部(UC)，④下側中央部 (LC)）に等分割した (a, b)。PLA ケージで囲われた部分及び新生骨を二値化し、全体及び各領域の面積 (c, d) を 100 %とした場合の新生骨の占める割合 (n-Bone%) を算出した。

(2.6 に詳細な算出方法を記載した (図21～図 28) 。)

(Yanagisawa T, et al, Clin Exp Dent Res 2020 より引用)

## 2.2.8 統計解析方法

統計解析は、12週時の n-Bone% について 2013 for Excel (Microsoft Co, Redmond, WA, US) を用いて行った。すべての値は平均±標準偏差 (SD) として示した。カイ二乗検定より、各群が正規分布を有するかどうかを試験し Bartlett検定を用いて検体間の分散の同等性を調べた。一元配置分散分析 (ANOVA) または Kruskal-Wallis 検定を用いて群間の平均を比較した。有意差は  $P < 0.05$  を基準とした。有意差が平均値で検出された場合、Tukey-Kramer または Scheffe's の多重比較分析を事後検定として使用した。

## 2.3 結果

### 2.3.1 マイクロ CT 測定 (図 13)

図の上側は皮膚側を示し下側は既存骨側を示す。

- (1) N, S 群について, 試料埋入後 4 週では不透過像の面積の割合が透過像に比べて多い。辺縁部及び既存骨側における不透過像の面積が大きい。試料埋入後 4 週から経時的に不透過像の面積が増大している。試料埋入後 12 週では, 既存骨側と左右縁側の不透過像の面積が顕著に増大している。中央部の不透過像の面積が辺縁部に比べて小さい。
- (2) B 群では, 試料埋入後 4 週では, 透過像の面積が不透過像の面積に比べて多い。辺縁部における不透過像の面積が大きい。試料埋入後 4 週から経時的に不透過像の面積が増大している。しかし, その割合は, 他群と比べて小さい。試料埋入後 12 週では, 中央部の不透過像の面積が辺縁部と比べて小さく, 他群と比べても小さい。

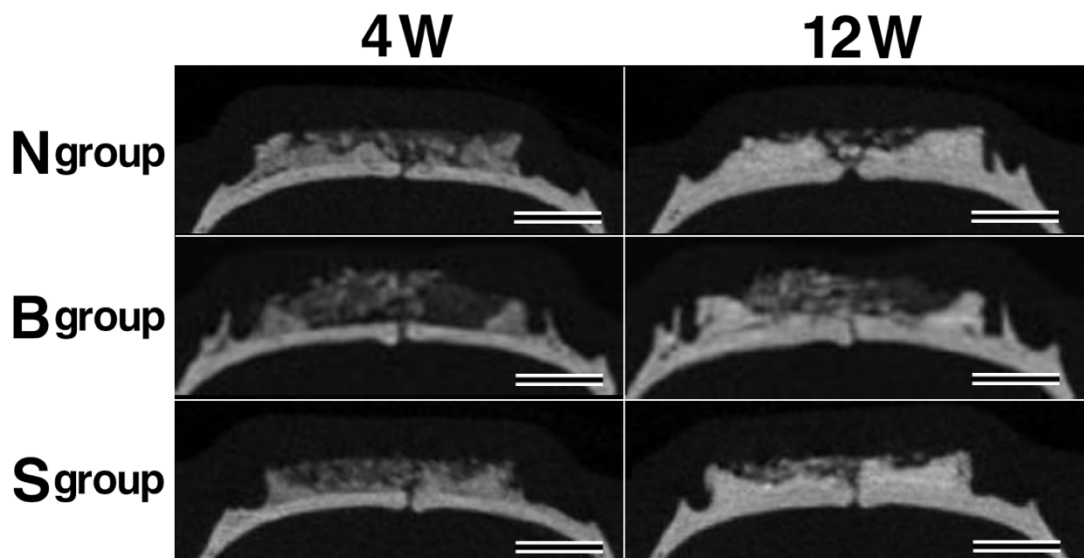


図13：試料埋入後 4, 12週時のマイクロ CT 測定結果

図の上側は皮膚側を示し下側は既存骨側を示す。全群について, 埋入 4 週から 12 週にかけて辺縁部及び既存骨側における不透過像の面積が顕著に増大している。B 群では, 試料埋入後 12 週では, 中央部の不透過像の面積が辺縁部と比べて小さく, 他群と比べても小さい。バー: 3 mm

(全試料の測定結果について 2.7 に掲載した(図29～図31)。)

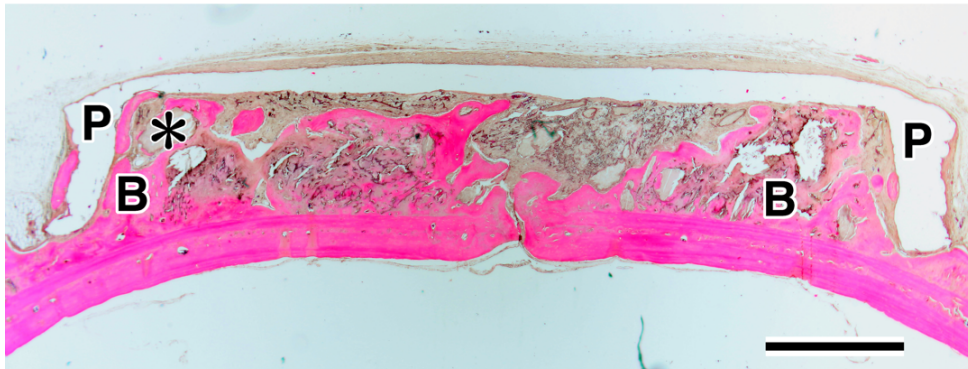
(Yanagisawa T, et al, Clin Exp Dent Res 2020 より引用)

### 2.3.2 組織学的観察

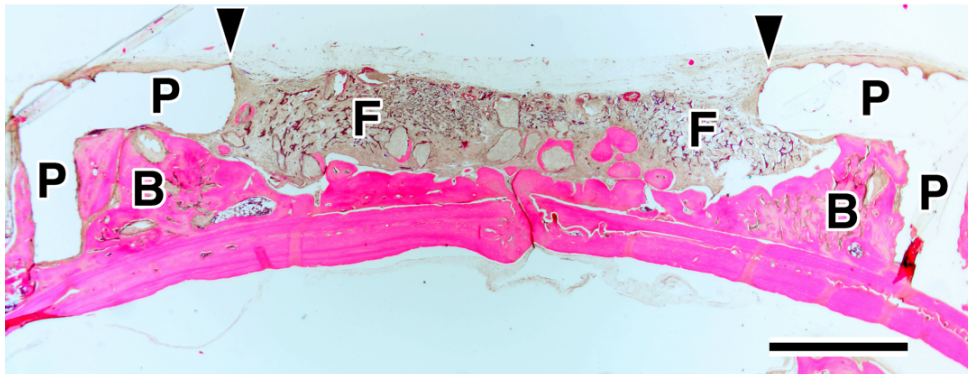
図の上側は皮膚側を示し下側は既存骨側を示す。

- (1) N群では、新生骨は既存骨側から皮膚側及びPLAに沿って伸びていた（図14，図 15 UM）。新生骨は既存骨側及び辺縁部で多く、新生骨は、能動的な骨再構築を伴うモザイク状を示した（図14，図 15 LM, LC）。UC において、PLA近傍に新生骨が形成されていた（図14，図 15 UC）。
- (2) B群は、新生骨は既存骨側から皮膚側及びPLAに沿って伸びていた（図14，図 16 UM）。新生骨は既存骨側及び辺縁部で多く新生骨は、能動的な骨再構築を伴うモザイク状を示した（図14，図 16 LM, LC）。UC において、PLAに覆われていない部分は線維組織で満たされており、PLAに覆われていない部分の近傍で新生骨は形成されていなかった（図14，図 16 UC）。
- (3) S群は、新生骨は既存骨側から皮膚側及びPLAに沿って伸びていた（図14，図 17 UM）。新生骨は既存骨側及び辺縁部で多く能動的な骨再構築を伴うモザイク状を示した（図14，図 17 LM, LC）。UC において、PLAに覆われていない部分は線維組織で満たされており、新生骨は形成されていなかった。PLA下側近傍において、新生骨が形成されていた（図14，図 17UC）。

## N group(12W)



## B group(12W)



## S group(12W)

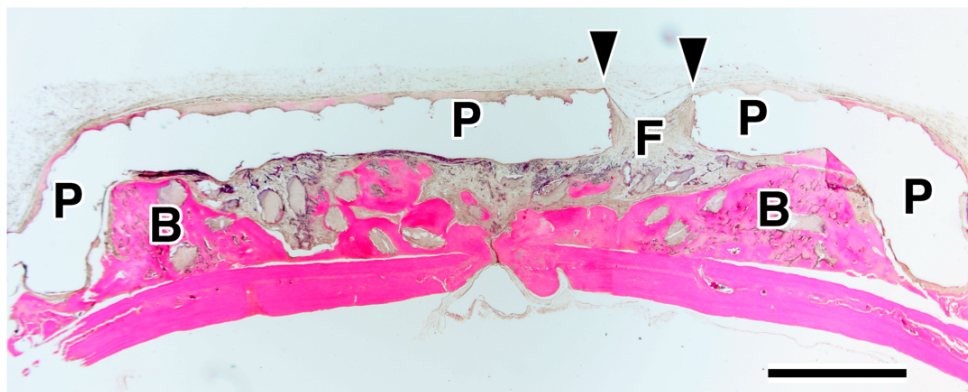


図14：各群の全体における埋入後12週時の組織学的観察

図の上側は皮膚側を示し下側は既存骨側を示す。新生骨は既存骨側から皮膚側及びPLAに沿って伸びていた (N, B 及び S - Total)。バー：3 mm, アスタリスク：OCP, B: 新生骨, P: PLA ケージ, F: 線維組織, ▼: 孔形成位置 (全試料の測定結果については 2.7 に掲載した (図32～図34)。)

(Yanagisawa T, et al, Clin Exp Dent Res 2020 より引用)



## N group(12W)

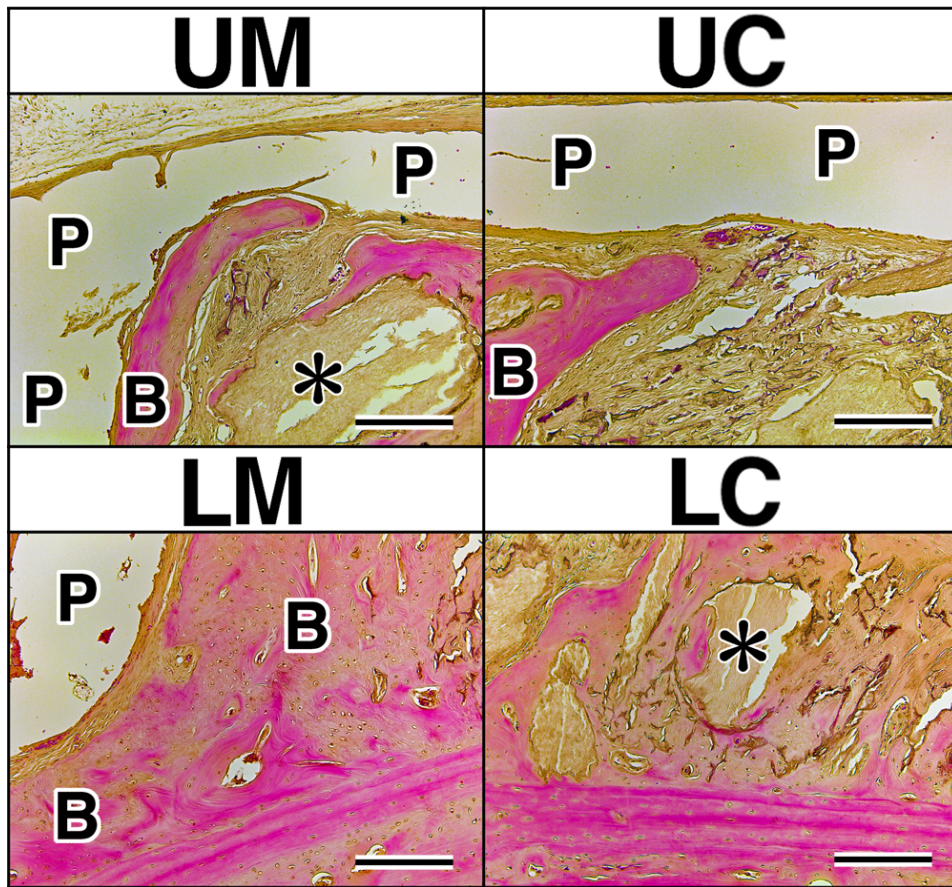


図15：N群の各領域における埋入後12週時の組織学的観察

上段には上側辺縁部 (UM)，上側中央部(UC)及び下段には下側辺縁部 (LM)，下側中央部(LC)を示す。図の上側は皮膚側を示し下側は既存骨側を示す。新生骨は既存骨側から皮膚側及びPLAに沿って伸びていた (UM)。新生骨形成量は既存骨側及び辺縁部で多く，新生骨は，能動的な骨再構築を伴うモザイク状を示した (LM, LC)。N群では，新生骨がPLAケージに接して形成されていた (LM, UM)。バー：200  $\mu$ m，アスタリスク：OCP，B: 新生骨，P: PLAケージ

(Yanagisawa T, et al, Clin Exp Dent Res 2020 より引用)

## B group(12W)

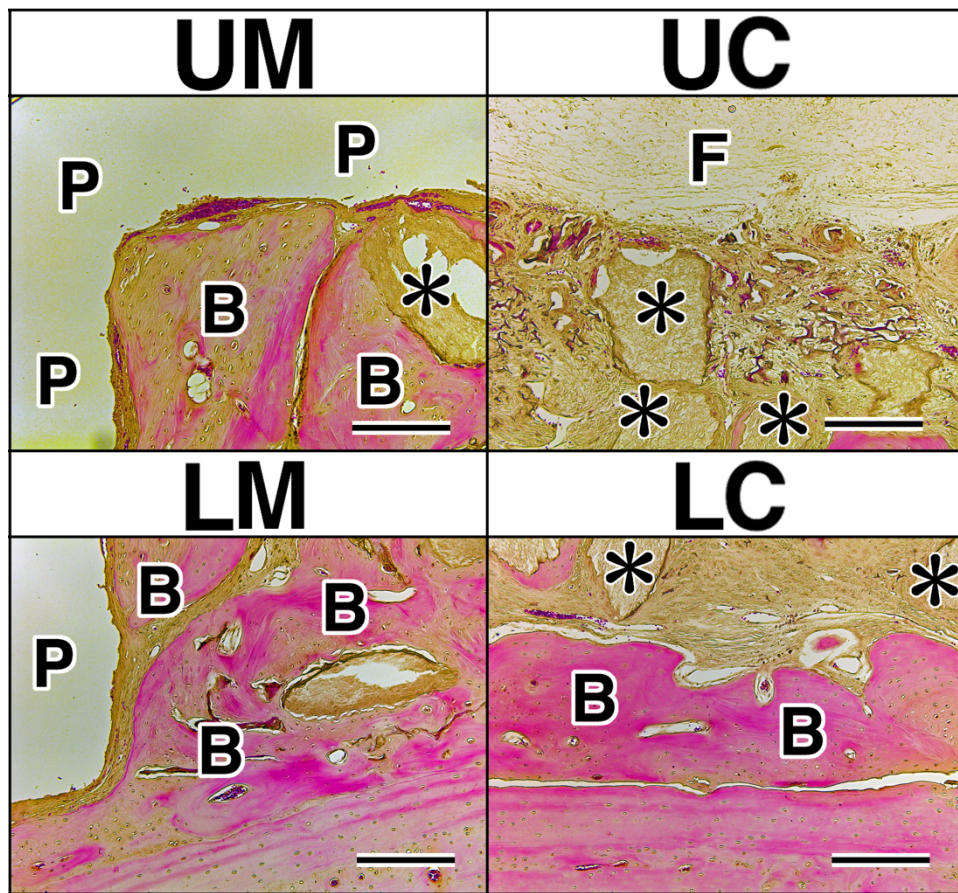


図16：B群の全体及び各領域における埋入後12週時の組織学的観察

上段にはB群の上側辺縁部(UM)，上側中央部(UC)及び下段にはBの下側辺縁部(LM)，下側中央部(LC)を示す。図の上側は皮膚側を示し下側は既存骨側を示す。新生骨は既存骨側から皮膚側及びPLAに沿って伸びていた(UM)。新生骨形成量は既存骨側及び辺縁部で多く，新生骨は，能動的な骨再構築を伴うモザイク状を示した(LM, LC)。PLAケージの孔と孔周辺が線維組織で満たされており，PLAケージの孔と骨膜の下に新生骨が形成されていなかった(UC)。

バー：200  $\mu\text{m}$ ，アスタリスク：OCP，B：新生骨，P：PLAケージ，F：線維組織 (Yanagisawa T, et al, Clin Exp Dent Res 2020 より引用)



## S group(12W)

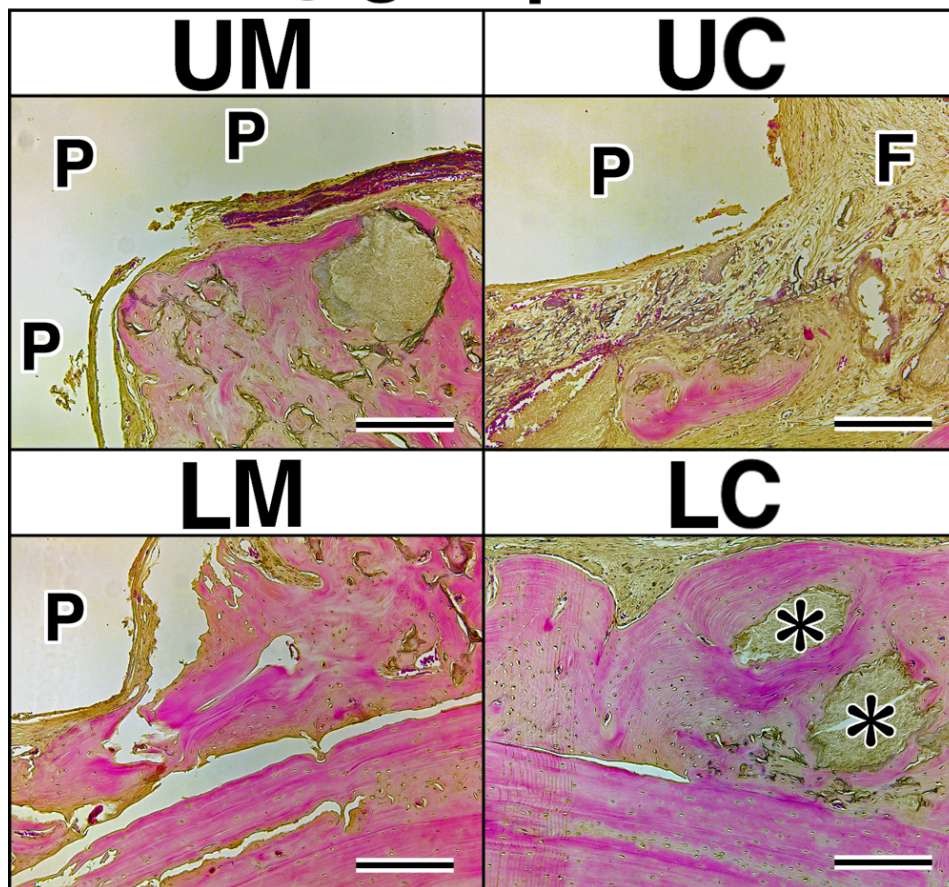


図17：S群の各領域における埋入後12週時の組織学的観察

上段には上側辺縁部 (UM) ，上側中央部(UC)及び下段には下側辺縁部 (LM) ，下側中央部(LC)を示す。図の上側は皮膚側を示し下側は既存骨側を示す。新生骨は既存骨側から皮膚側及びPLAに沿って伸びていた (UM) 。新生骨形成量は既存骨側及び辺縁部で多く，新生骨は，能動的な骨再構築を伴うモザイク状を示した (LM, LC) 。PLA ケージの孔と孔周辺が線維組織で満たされており，PLA ケージの孔と骨膜の下に新生骨が形成されていなかった(UC)。しかしながら，新生骨は皮膚側のPLAの近傍で所々形成されていた(UC)。

バー：200  $\mu$ m ，アスタリスク：OCP ， B: 新生骨，P: PLA ケージ， F: 線維組織 (Yanagisawa T, et al, Clin Exp Dent Res 2020 より引用)



### 2.3.3 組織学的形態計測による定量解析

表 6 に，N 群，B 群，S 群の全体及び各領域(LM, LC, UM, UC)での新生骨量の数値を表及び概略図を示した。


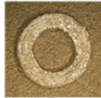


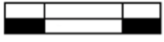
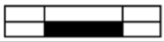
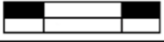

全体における再生骨率は，S 群( $52.0 \pm 7.4\%$ )，N 群( $50.3 \pm 13.4\%$ )，B 群( $41.0 \pm 7.3\%$ )の順で高いが，優位差は認められなかった(表 6，図 18)。各群での再生骨率はいずれも LM，LC，UM，UC の順で高い(表 6，図19)。

N 群の有意差は，LM( $72.5 \pm 14.2\%$ )と UC( $23.0 \pm 15.2\%$ )，LC( $60.5 \pm 13.2\%$ )と UC( $23.0 \pm 15.2\%$ )で認められた(表6, 図 19)。

B 群の有意差は，LM( $64.6 \pm 13.4\%$ )と UC( $13.4 \pm 7.5\%$ )及び UM( $34.0 \pm 10.7\%$ )，LC( $55.4 \pm 8.5\%$ )と UC( $13.4 \pm 7.5\%$ )及び UM( $34.0 \pm 10.7\%$ )，UM( $34.0 \pm 10.7\%$ )と UC( $13.4 \pm 7.5\%$ )であった(表6, 図 19)。

S 群の有意差は，LM( $75.3 \pm 10.4\%$ )と UC( $27.6 \pm 11.6\%$ )及び UM( $42.7 \pm 13.0\%$ )，LC( $61.2 \pm 9.1\%$ )と UC( $27.6 \pm 11.6\%$ )で認められた( $P < 0.05$ )(表6, 図 19)。

表 6: 各群の全体及び各領域における再生骨率 (n-Bone%) の定量分析

Schematic view	Area	N group 	B group 	S group 
	Total	$50.3 \pm 13.4\%$	$41.0 \pm 7.3\%$	$52.0 \pm 7.4\%$
	LM	$72.5 \pm 14.2\%$	$64.6 \pm 13.4\%$	$75.3 \pm 10.4\%$
	LC	$60.5 \pm 13.2\%$	$55.4 \pm 8.5\%$	$61.2 \pm 9.1\%$
	UM	$44.9 \pm 19.1\%$	$34.0 \pm 10.7\%$	$42.7 \pm 13.0\%$
	UC	$23.0 \pm 15.2\%$	$13.4 \pm 7.5\%$	$27.6 \pm 11.6\%$

(Yanagisawa T, et al, Clin Exp Dent Res 2020 より引用)

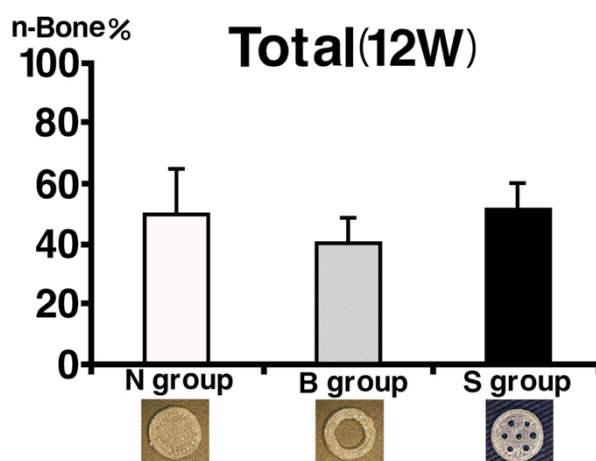


図18：各群の全体領域における新生骨の定量解析

n-Bone%はS，N，B群の順で値が高いが、これらの間に有意差はなかった。

(Yanagisawa T, et al, Clin Exp Dent Res 2020 より引用)

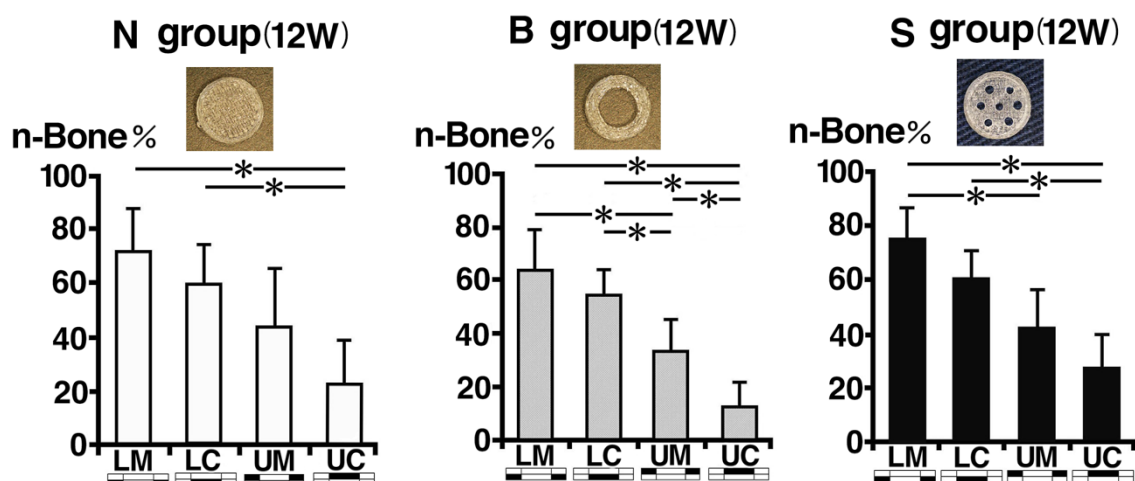


図19：N，B及びS群の各領域における新生骨の定量解析

N，B及びS群において，再生骨率は下側辺縁部（LM），下側中央部（LC），上側辺縁部（UM），上側中央部（UC）の順で高い。

N群における有意差は，下側辺縁部（LM）と上側中央部（UC），下側中央部（LC）と上側中央部（UC）で認められる（\*：P < 0.05）。

B群における有意差は，下側辺縁部（LM）と上側中央部（UC）及び上側辺縁部（UM），下側中央部（LC）と上側中央部（UC）及び上側辺縁部（UM），上側辺縁部（UM）と上側中央部（UC）であった（\*：P < 0.05）。

S群における有意差は，下側辺縁部（LM）と上側中央部（UC）及び上側辺縁部（UM），下側中央部（LC）と上側中央部（UC）で認められた（\*：P < 0.05）。

(Yanagisawa T, et al, Clin Exp Dent Res 2020 より引用)

## 2.4 考察

今回の研究では、TPTD を添加した OCP/Col を PLA ケージで被覆した試料をラットの骨膜下の頭蓋骨冠上に埋入した結果、12 週時では、既存骨の約 2 倍の厚さの新生骨が形成され、垂直的骨造成が達成された。この結果は、以前の垂直的骨造成に関して報告された結果 (54, 55) と比較して優位に上回っている。また、頭蓋骨に形成された骨欠損において TPTD を添加した OCP/Col は TPTD を添加していない OCP/Col に比べて骨再生を促進させることが報告されている (87)。さらに、TPTD は骨芽細胞と破骨細胞による新生骨のリモデリングを促進させる効果が期待できる (101)。そのため、TPTD を OCP/Col に添加することにより垂直的骨造成が促進したと考えられる。加えて PLA ケージは、OCP/Col の形状を維持し、線維組織の OCP/Col への侵入を阻害する。OCP/Col の上面すべてを PLA ケージで被覆した場合、新生骨は所々で中央部も含めて PLA ケージの上面と接して形成された。しかしながら、前述のことは、OCP/Col の外周のみを PTFE で囲った試料では観察されなかった (54)。同様に、孔が形成された PLA ケージには線維組織が侵入したため、PLA ケージ付近において OCP/Col に新生骨が形成されていない。このことは、線維組織が新生骨形成を阻害し、PLA ケージで OCP/Col を被覆することで、垂直的骨造成を促進させることを示している。

マイクロ CT 画像より、N 群、B 群及び S 群ともに、4 週から 12 週にかけて、既存骨側及び辺縁部において放射線不透過像が時間経過とともに充進している。12 週において、皮膚側中央の B 群と N、S 群の画像を比較すると、B 群は透過像の面積が大きく、N、S 群は局所的に透過像が存在する。B 群の皮膚側中央の透過像の面積が大きいのは、PLA ケージ中央に孔が形成されているためと考えられる。S 群も B 群と同様に PLA ケージに孔が形成されているが、透過像が B 群と比べて少なく、B 群と比べて孔の径が小さかったため、影響が限定的であったと考えられる。なお、不透過像に関しては、OCP/Col が埋入された位置に形成された新生骨と、細胞が関与しないで OCP/Col から転換したアパタイトであることが知られている (87)。したがって、不透過像はすべて新生骨であるとは言えないため、新生骨を求めるため、組織観察を行った。

組織観察より、N 群、B 群及び S 群ともに既存骨側から皮膚側に向かって新生骨が形成されている。特に既存骨の近くや PLA ケージ周縁において新生骨が多い。既存骨側から皮膚側に向かって形成されている新生骨の大部分は、既存骨から連続して形成されている新生骨であるが、所々では、連続して形成されている新生骨から離れた箇所でも新生骨が部分的に形成されている。また、B 群及び S 群では、PLA ケージの孔が線維組織で満たされ、新生骨は確認されなかった。また、骨膜周辺においても新生骨は確認されなかった。既存骨側の新生骨形成に関連して、OCP は既存骨の骨芽細胞や bone lining cells や骨形成前駆体に作用し、新生骨形成に関与することが述べられている (102)。このことから、既存骨の骨形成細胞が OCP/Col と相互作用することにより、新生骨形成が促進されと考えられる。次に、PLA ケージ内周縁の新生骨形成量が多いことに関連して、OCP/Col の周囲に PTFE を設置することでメカニカルストレスを緩和した結果、PTFE 周縁に新生骨が形成されたことが報告されている (54)。また、PLA 周辺では新生骨が形成されることが報告されている (90)。また、試料埋入後の初期の段階において骨形成前駆体の分化や血管形成の促進さ

れることから (60) (図 20), 今回の場合は, 血液等を介して OCP/Col に侵入した骨前駆体から分化した骨形成細胞により PLA ケージ周縁において新生骨形成が促進したと考えられる。他方, PLA ケージの孔およびその近傍が線維組織で満たされたため, 新生骨の形成が認められなかったことから, 骨膜が積極的に骨形成に関与しないと考えられる。

N 群, B 群及び S 群の全体における n-Bone% について, 有意な差は認められなかった。このことは, 骨形成量に関して, OCP/Col に TPTD を添加することと OCP/Col を PLA で被覆することが, PLA の形状 (PLA の上面にいくつかの種類の孔を形成すること) に比べて効果があったことを示している。一方で, N 群, B 群及び S 群の各領域における n-Bone% について, 全群ともに LM (64.6 ~ 75.3 %), LC (55.4 ~ 61.2 %), UM (34.0 ~ 44.9 %), UC (13.4 ~ 27.6 %) の順で高かった (表 6)。UC における n-Bone% は, N 群は 23.0 %, B 群は 13.4 %, S 群は 27.6 % であり, B 群は他群に比べて低い。この理由は, B 群における UC は, PLA ケージに覆われていなく, 直接に骨膜に接している状態で多くの線維組織が孔から侵入すると新生骨の形成が阻害されるという報告がある (54)。一方, S 群の孔は B 群に比べて小さいため, 新生骨形成への影響は限定的であったと考えられる。以前の研究から骨膜は新生骨の形成に影響するという報告があるが (86), PLA ケージに形成された孔周辺には新生骨が形成されていなかった。このことは, 今回の研究に限定すると, 骨膜は新生骨形成に影響を及ぼさなかったと考えられる。UM における n-Bone% は, N 群は 44.9 %, B 群は 34.0 %, S 群は 42.7 % であり, B 群は他群に比べて値が低く, UC は UM に比べて有意に低い。このことは, B 群における UM は, PLA ケージが皮膚側を部分的に覆っているためと考えられる。組織観察を参考にする, 線維組織の侵入量が多いと新生骨形成量が低下するが, 線維組織の侵入量が少ないと, 新生骨の形成に影響が少ないと考えられる。LC における n-Bone% は, N 群は 60.5 %, B 群は 55.4 %, S 群は 61.2 % であり, 全ての群について, 皮膚側の UC, UM に比べて値が高く, 既存骨側が新生骨形成に影響していると考えられる。LM における n-Bone% は, N 群は 72.5 %, B 群は 64.6 %, S 群は 75.3 % であり, 全ての群について, UC, UM, LC に比べて値が高く, 既存骨側であること及び PLA ケージと接することが新生骨形成に影響していると考えられる。したがって, 既存骨及び血液中の骨形成細胞が OCP/Col に侵入し, PLA ケージを伝うことで新生骨の形成に影響したと考えられる。

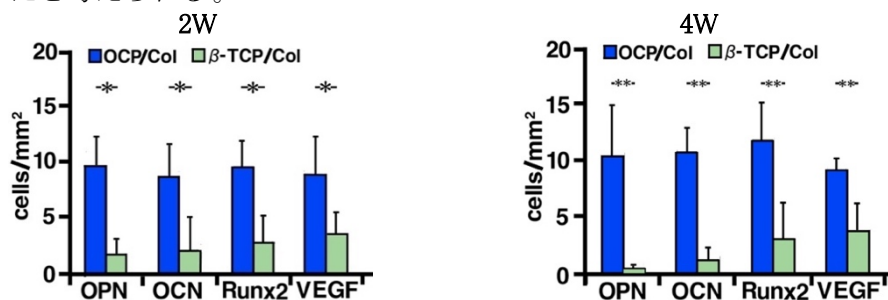


図 20: OCP/Col と  $\beta$ -TCP/Col の骨分化マーカー (OPN, OCN, Runx2) と血管形成増殖因子 (VEGF) の数 (埋入 2 週, 4 週), (60) を参考にグラフを作成 \* :  $P < 0.05$ , \*  
\* :  $P < 0.01$

OPN: osteopontin, OCN: osteocalcin, Runx2: runt-related transcription factor,  
VEGF: vascular endothelial growth factor

## 2.5 結論

本研究では、OCP/Colに TPTD を添加して新生骨形成を促し、PLAによる被覆により、OCP/Colの形状を維持すると共に線維組織のOCP/Colへの侵入を抑制したことにより垂直的骨造成を促進できた。

新生骨形成の主な要因は、既存骨の骨形成細胞がOCP/Colと相互作用することにより、新生骨形成が促進したと考えられる。その他の要因として、PLAケージ周縁において新生骨ができることから(103)、血液等を介してOCP/Colに侵入した骨前駆体が骨形成細胞に分化してPLAケージ周縁において、OCP/Colを核として新生骨形成が促進したと考えられる。他方、新生骨形成を抑制した要因は、過去の報告(54)と同様に、PLAケージの孔から侵入した線維組織の量が影響したと考えられる。例えば、PLAケージの孔が大きい場合は皮膚側から侵入する線維組織の影響を受けて新生骨の形成が低下するが、孔が限定的であると、新生骨の形成が少ないためである。また、骨膜に関して、新生骨形成に関与するのと報告があるが(86)、孔近傍において新生骨が形成されていないことから、本研究では新生骨形成に積極的に関与しなかったと考えられる。

## 2.6 新生骨率算出方法（詳細）

### 組織定量的解析手順

具体的な手順を以下に示す。

- (1) 各パラフィン標本の中心部から薄切りされた複数枚の切片を選択した。
- (2) 同切片を光学顕微鏡 (Leica DM2500, Leica Microsystems Japan, Tokyo, Japan) を用いて、切片上の欠損全域が 1 枚の写真に含まれるよう低倍率( $\times 1.25$ )で撮影した。
- (3) デジタル画像を Photoshop (Adobe System Incorporated, USA) に取り込み、試料以外の部分を消去する。
- (4) (3) のデジタル画像を paint (Microsoft Co, Redmond, WA, USA) に取り込み、座標軸を用いて、水平方向を 4 等分し、その後鉛直方向を 2 等分し、試料を計 8 分割した（詳細は以下①～④）。
- ①試料の水平方向が 4 等分となるように骨膜側と既存骨側を結ぶ垂直線を引く。
- ②鉛直方向において、垂直線と試料の骨膜側及び既存骨側の交点の中心位置をプロットする。
- ③プロットした点を直線で結ぶ。
- ④上記より試料の面積を 8 分割する（図21）。

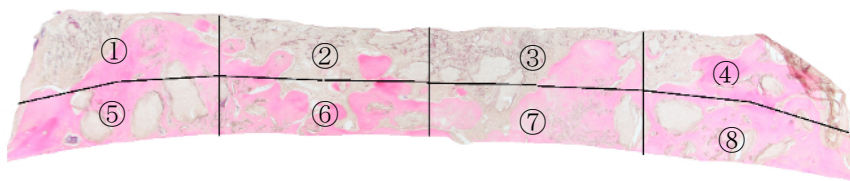


図21：8等分された試料

- (5) 8分割されている OCP/Col 及び新生骨の面積を、下記の 4 領域に分ける（図22）。
- ①と④を骨膜側辺縁部 (UM) とした。
- ⑤と⑧を既存骨側辺縁部 (LM) とした。
- ②と③を合わせた面積全体を骨膜側中央部 (UC) とした。
- ⑥と⑦を合わせた面積全体を既存骨側中央部 (LC) とした。

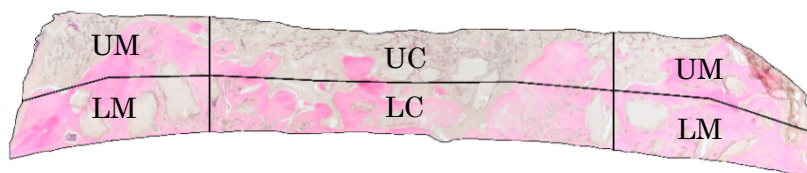


図22：4等分された試料（領域指定）

(6) Photoshop により，新生骨のカラーを明瞭にする（図23）。



図23：新生骨が明瞭化された試料

(7) 新生骨以外の部分を消去する。

(8) 画像解析ソフト (ImageJ: National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて二値化（白と黒）を行う（詳細は以下①～④）（図24～ 28）。

① ImageJ にデジタル画像（全体，各領域 (UM, LM, UC, LC)）を取り込む。

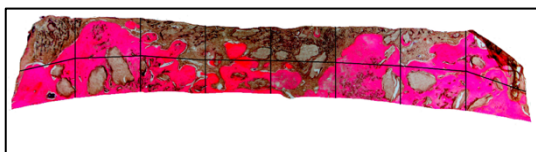
② Image の Type から 8 bit を選択する。

③ Image の Adjust から Threshold を選択する。

④ Default 及び B & W を選択する。

## 全 体 (Total)

埋入試料 (カラー)



埋入試料 (白)



埋入試料 (新生骨)



新生骨 (白)



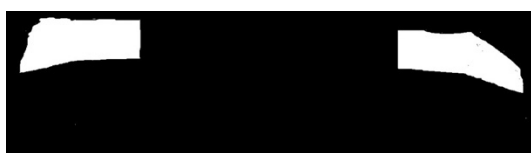
図24：二値化处理 (Total)

## 骨膜側辺縁部 (Upper Marginal: UM)

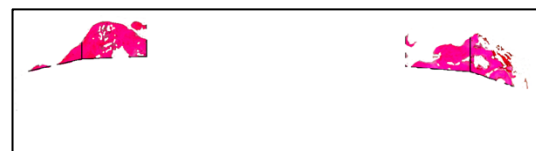
埋入試料 (カラー)



埋入試料 (白)



新生骨 (赤)



新生骨 (白)

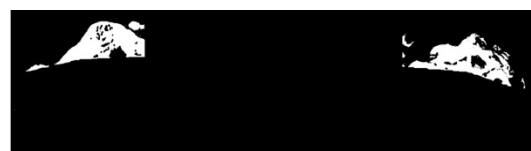
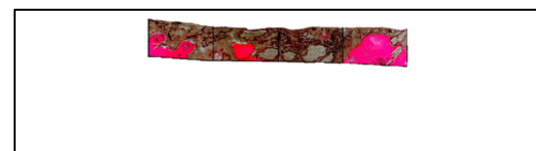


図25：二値化处理 (UM)

## 骨膜側中央部 (Upper Central: UC)

埋入試料 (カラー)



埋入試料 (白)



埋入試料 (新生骨)



埋入試料 (白)

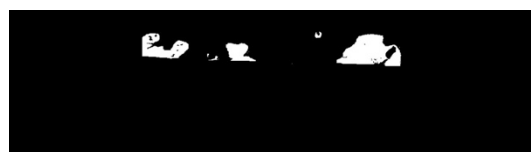
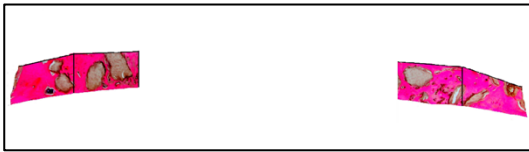


図26：二値化处理 (UC)



#### 既存骨側辺縁部(Lower Marginal: LM)

埋入試料（カラー）



埋入試料（白）



新生骨（赤）



新生骨（白）

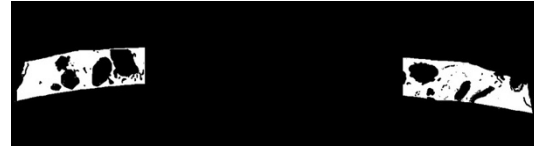


図27：二値化处理 (LM)

#### 骨膜側中央部 (Lower Central: LC)

埋入試料（カラー）



埋入試料（白）



新生骨（赤）



新生骨（白）

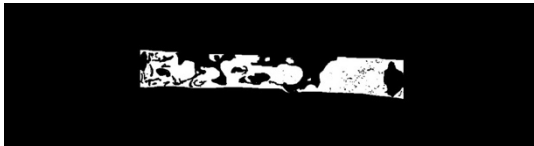


図28：二値化处理(LC)

(9) 二値化（白と黒）をした OCP/Col 全体及び新生骨全体，各領域(UM, LM, UC, LC)及び各領域の新生骨の面積を求める。（詳細は①～④）

- ① Analyze の Set Measurement から Area fraction を選択する。
- ② Analyze の Measure により埋入試料と新生骨それぞれのデジタル画像の Area fraction を算出する。
- ③ File の Save Results から Excel（マイクロソフト社）ファイルを選択して保存する。
- ④ 全体及び各領域の埋入試料 %Area と新生骨の %Area より新生骨の割合を算出する。

## 2.7 第2章の測定結果(全試料)

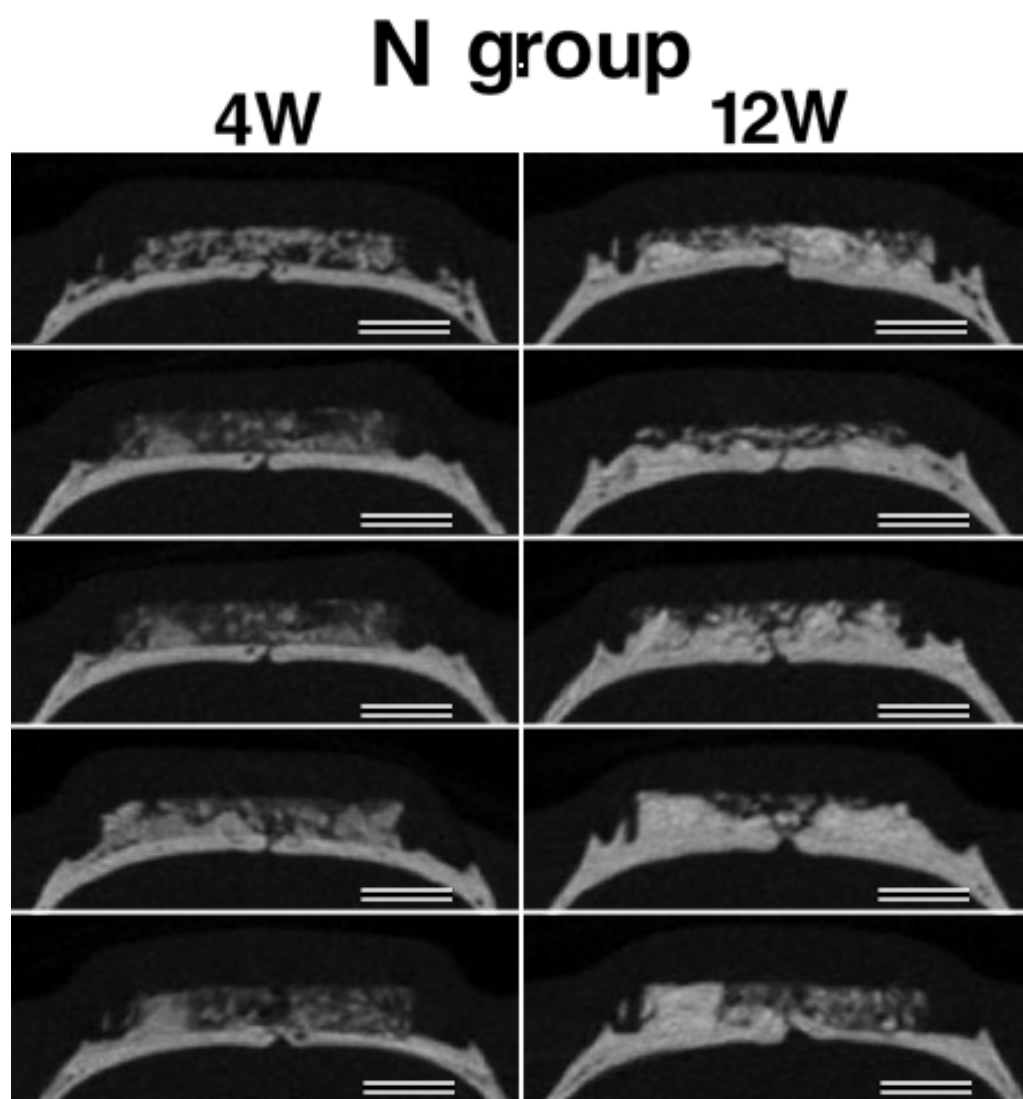


図29：N群の埋入後4，12週時のマイクロCT測定結果

図の上側は皮膚側を示し下側は既存骨側を示す。左列は4週時，右列は12週時の測定結果を示す。4週では不透過像の面積の割合が透過像に比べて多い。辺縁部及び既存骨側における不透過像の面積が大きい。埋入4週から経時的に不透過像の面積が増大している。12週では，既存骨側と左右縁側の不透過像の面積が顕著に増大している。中央部の不透過像の面積が辺縁部に比べて小さい。

バー：3 mm

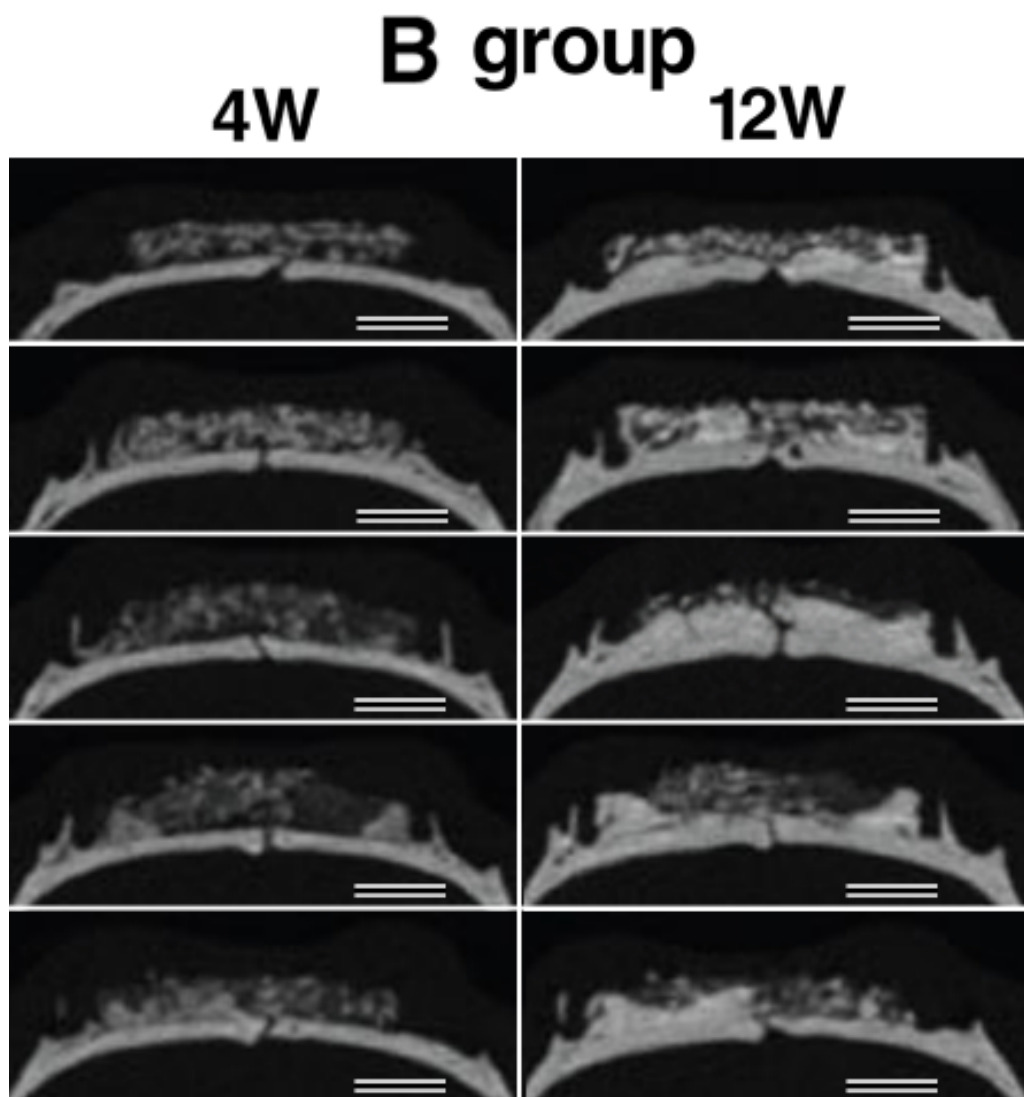


図30：B群の埋入後4，12週時のマイクロCT測定結果

図の上側は皮膚側を示し下側は既存骨側を示す。左列は埋入後4週時，右列は埋入後12週時の測定結果を示す。埋入後4週では，透過像の面積が不透過像の面積に比べて多い。辺縁部における不透過像の面積が大きい。埋入4週から経時的に不透過像の面積が増大している。しかし，その割合は，他群と比べて小さい。埋入後12週では，中央部の不透過像の面積が辺縁部と比べて小さく，他群と比べても小さい。

バー：3 mm

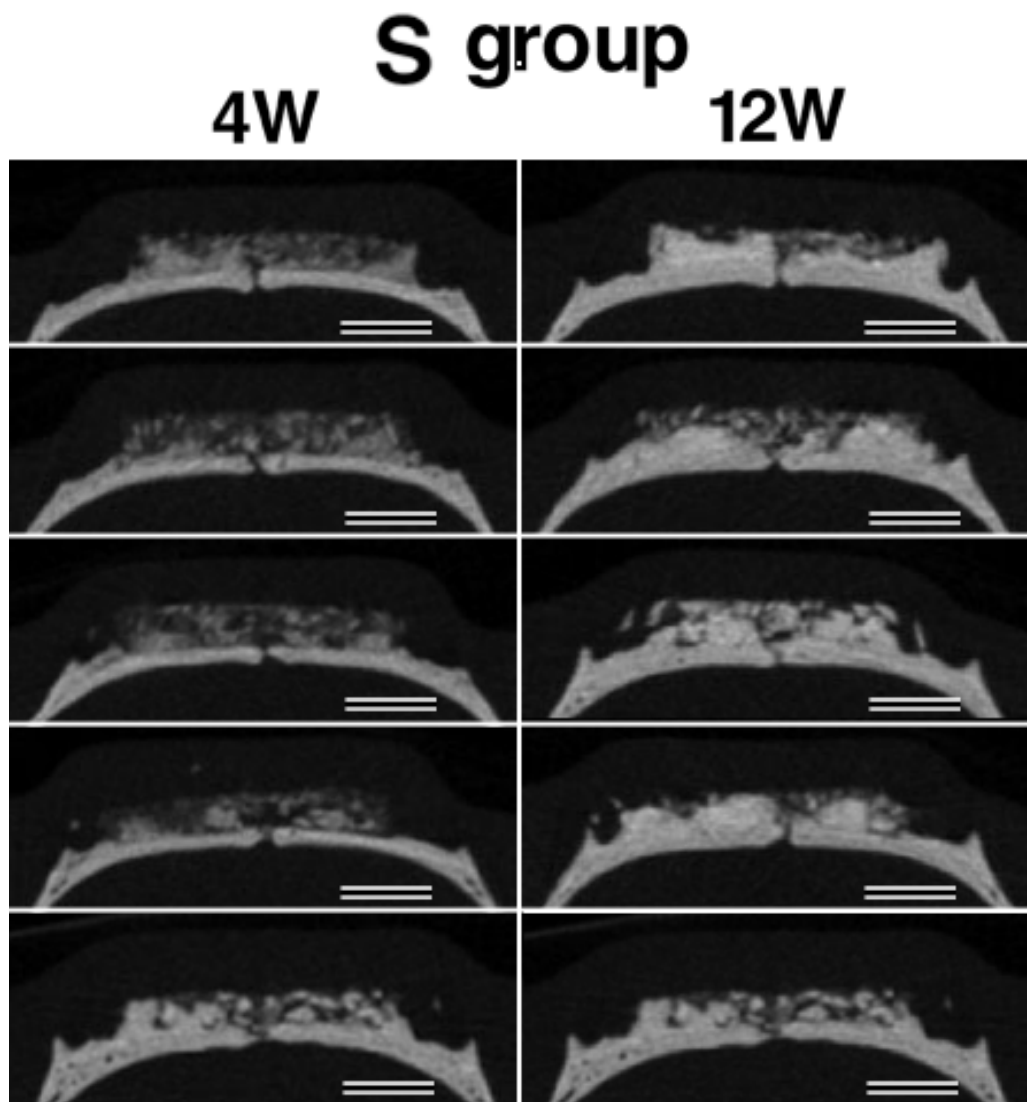


図31： S 群の埋入後 4，12 週時のマイクロ CT 測定結果

図の上側は皮膚側を示し下側は既存骨側を示す。左列は埋入後 4 週時，右列は埋入後12週時の測定結果を示す。図の上側は皮膚側を示し下側は既存骨側を示す。左列は 4 週時，右列は12週時の測定結果を示す。埋入後 4 週では不透過像の面積の割合が透過像に比べて多い。辺縁部及び既存骨側における不透過像の面積が大きい。埋入 4 週から経時的に不透過像の面積が増大している。埋入後 12 週では，既存骨側と左右縁側の不透過像の面積が顕著に増大している。中央部の不透過像の面積が辺縁部に比べて小さい。

バー： 3 mm

## N group(12W)

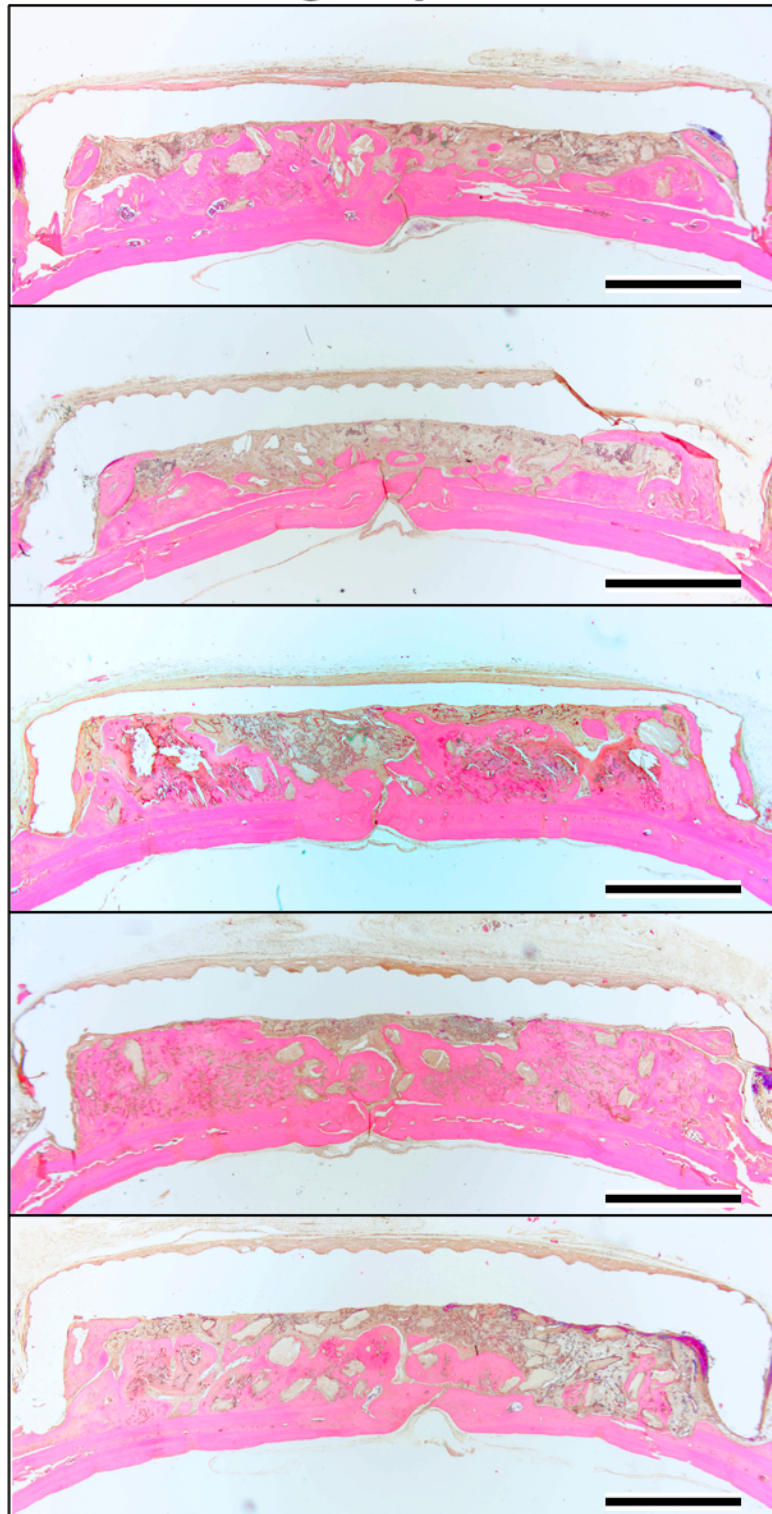


図32：N群の全体における埋入後12週時の組織学的観察

図の上側は皮膚側を示し下側は既存骨側を示す。新生骨は既存骨側から皮膚側及びPLAに沿って伸びていた。バー：3 mm



## B group(12W)

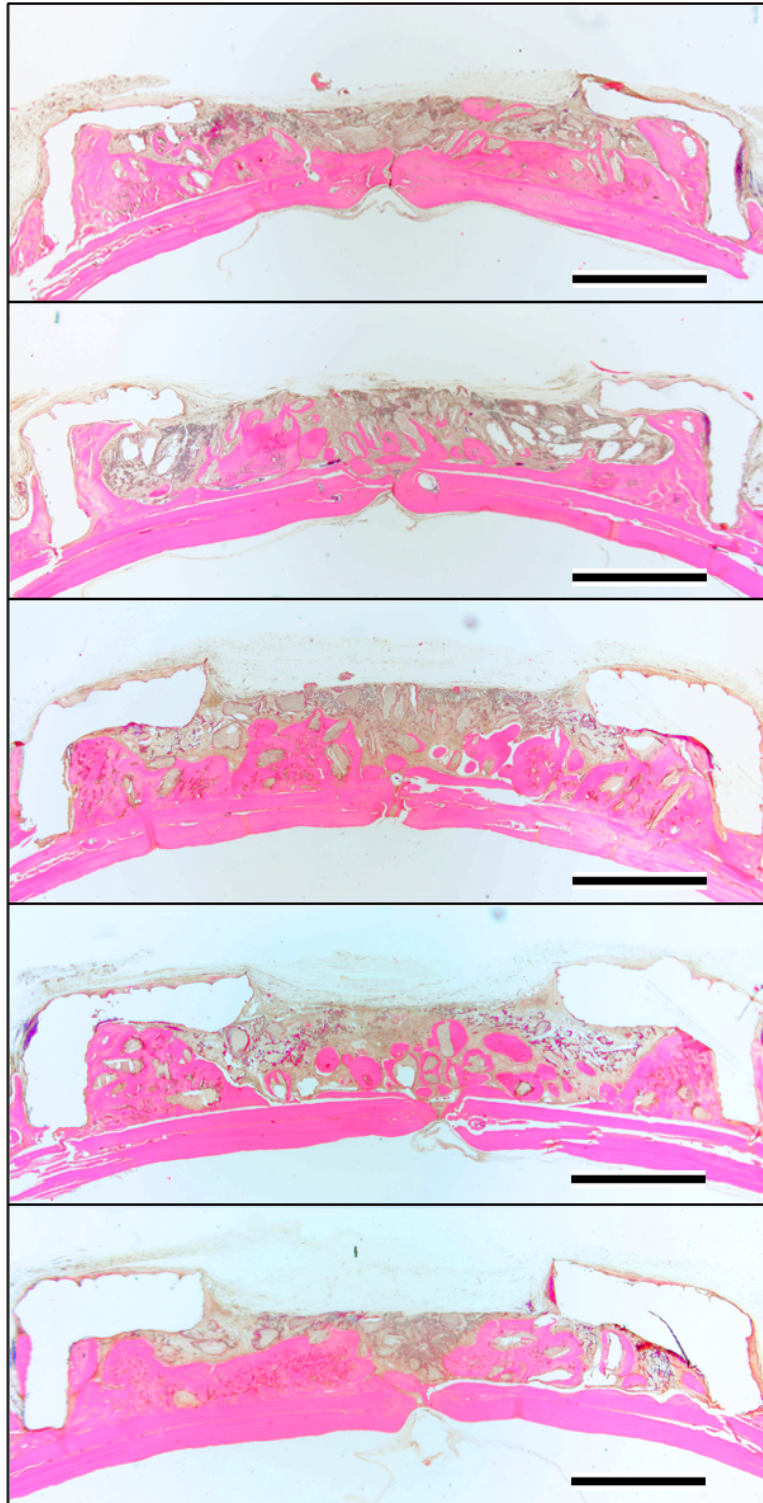


図33：B群の全体における埋入後12週時の組織学的観察

図の上側は皮膚側を示し下側は既存骨側を示す。新生骨は既存骨側から皮膚側及びPLAに沿って伸びていた。PLAケージの孔に線維組織が充填し、新生骨が形成されていない。バー：3 mm

## S group(12W)

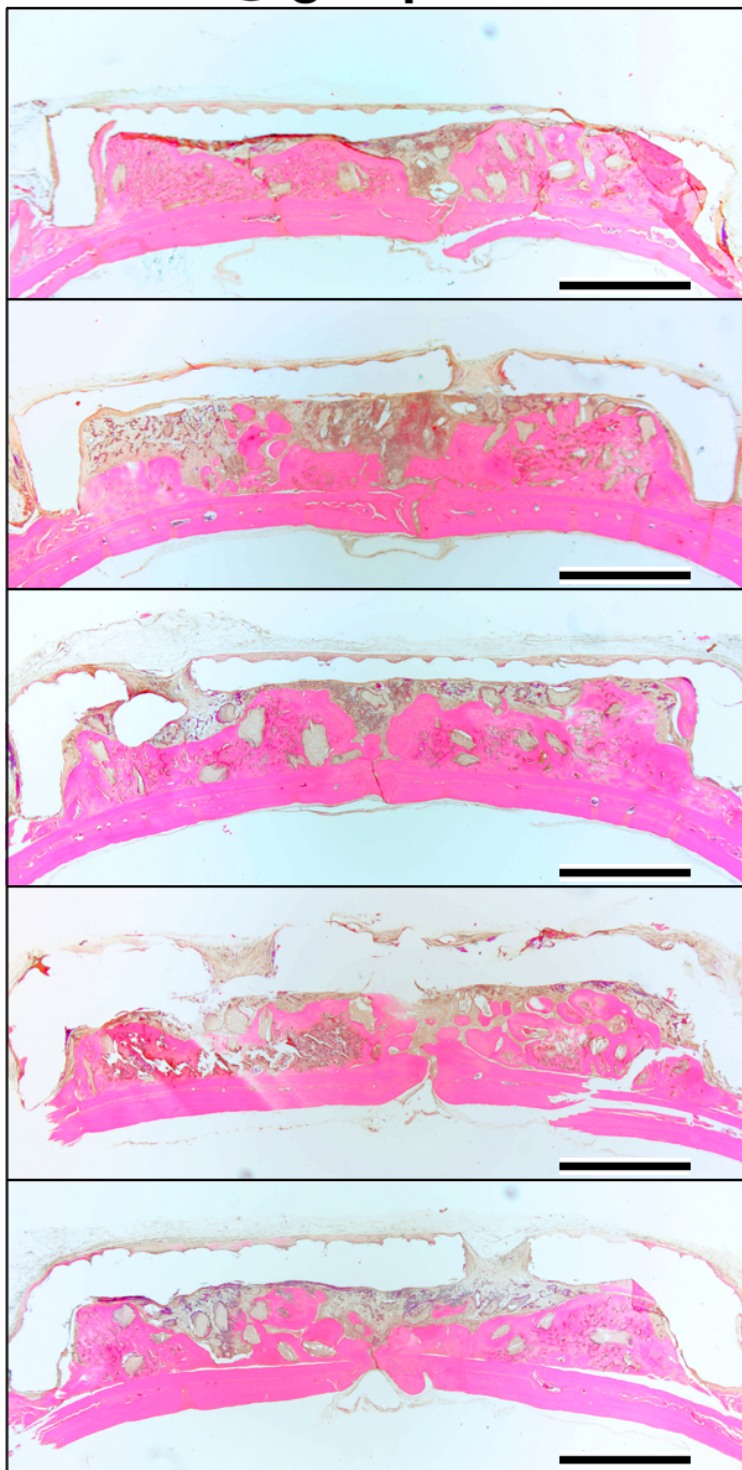


図34：S群の全体における埋入後12週時の組織学的観察

図の上側は皮膚側を示し下側は既存骨側を示す。新生骨は既存骨側から皮膚側及びPLAに沿って伸びていた。PLAケージの孔に線維組織が充填し、新生骨が形成されていない。バー: 3 mm

第3章 垂直的骨造成における  
オクタカルシウムフォスフェート  
・コラーゲン複合体 (OCP/Col) 製作時  
の予備凍結条件と密度の影響



## 3.1 緒言

### 3.1.1 第2章及び人工骨単独使用における課題

第2章において、OCP/ColにTPTDを添加して新生骨形成を促し、PLAによる被覆により、OCP/Colの形状を維持すると共に線維組織のOCP/Colへの侵入を抑制したことにより垂直的骨造成を促進できた。しかし、人工材料を併用する場合、非吸収性材料やPLAのように生体吸収性高分子材料の中で骨への置換に長期間要する材料であると摘出のための再手術が必要となり患者への侵襲性が高くなるといった課題がある。一方でOCP/Col単独では、外力の影響による試料の変形や多核巨細胞による試料の吸収により確実な垂直的骨造成は実現できていない(55)。また第1章で述べたように、その他のリン酸カルシウム系材料の単独使用について、ハイドロキシアパタイト(HAp)とリン酸三カルシウム( $\beta$ -TCP)それぞれについて試料をラットの頭蓋骨上の骨膜下に埋入した試験(80)が報告されているが、HApについて形状保持はできているが、新生骨形成が不十分であり、 $\beta$ -TCPは形状保持ができていない。そこで、本章では前述の課題を考慮し、垂直的骨造成の実現のためOCP/Col単独で形状保持と新生骨形成との促進を図ることを目的とした。

OCP/Colの形状保持ができない要因は、外力による構造体の変形と細胞による試料の吸収とが考えられる。これに関連して、本研究では、液体窒素を用いた試料の内部構造と細胞による吸収について着目した。

### 3.1.2 生体材料に液体窒素（冷却）を施した場合の効果

人工骨に液体窒素冷却を行うことにより、空孔サイズと組織再生に関しては過去に報告されている。空孔サイズに関して、poly(L-lactic acid)(PLLA)とHApとの混合材料やコラーゲン単独を液体窒素で凍結乾燥を行うことにより、空孔サイズが液体窒素冷却温度よりも高い温度を用いた場合と比べて小さくなるという報告がある(104, 105)。空孔サイズと組織再生の関係に関しては、空孔サイズの異なるコラーゲン足場に軟骨細胞を播種し、マウスの皮下に移植した際、空孔サイズが小さいと軟骨組織が効率よく再生されるという報告もある(106)。また、空孔サイズが小さいと線維組織の侵入を抑制する可能性が考えられる。これらのことから、液体窒素冷却を行うと材料の空孔サイズが小さく緻密な構造になり、組織再生の促進と線維組織侵入抑制に効果を及ぼす可能性がある。

### 3.1.3 生体組織に液体窒素（冷却）を施した場合の効果

一方で、生体組織に液体窒素冷却を行うことにより、生体組織の炎症反応抑制や組織の維持、細胞の増殖に関して報告されている。炎症反応に関して、ラットから摘出した半月板を液体窒素で冷却した後再移植すると免疫反応が抑制されるという報告(91)がある。組織の保持や細胞の増殖に関して、液体窒素冷却を行ったヒト由来の皮膚組織と室温でのヒト由来の皮膚組織を、各々生理食塩水で濃度を調整した試料をラットの皮下に注入した結果、室温処理した試料はコラーゲンマトリックスにダメージが発生し、試料が吸収及び喪失し、炎症が発生していたのに対し、液体窒素冷却した試料はコラーゲンマトリックスが保持され、炎症もほとんど無く、宿主細胞が増加されたという報告(107)がある。

人工骨を液体窒素冷却することについて、従来は空孔サイズなど内部構造と骨再生との

関係が主眼であったと考えられるが、本研究では、今まで人工骨では注目されなかった炎症反応抑制などの生体組織で示された反応が OCP/Col においても同様に示すのかという新しい観点にも着目し、試料の吸収抑制に繋がるのかについて検討を行なった。

#### 3.1.4 生体材料における密度と強度の関係

外力による試料の変形に関して、過去の報告では、コラーゲンスキャホールドの密度を増加させた場合 (108) や、コラーゲン・グリコサミノグリカン複合体スキャホールド中のグリコサミノグリカンの密度を増加させた場合に強度が高くなっている (109) 。また、新生骨形成促進に関して、また、骨形成が OCP の密度が依存すること、コラーゲンが骨芽細胞の増殖と付着を促進させること (58) が報告されている。

#### 3.1.5 本章の目的

本研究では、予備凍結で液体窒素を用いることで免疫反応や試料の吸収に関係する多核巨細胞の出現を抑制し、内部構造を緻密化することで、形状維持や新生骨形成ができるかを検討した。併せて、皮膚側からの外力に対して試料の強度を上げるため、OCP/Col 濃度を増加させて試料の密度を高めることにより形状保持や新生骨形成ができるかを検討した。

## 3.2 実験方法

### 3.2.1 OCP/Col の作製方法

OCP/Col の調整は第 2 章の方法で作製した。ブタ真皮由来コラーゲン (NMP コラーゲン PS , 日本ハム社製) の約 0.5 重量%のコラーゲン溶液に水酸化ナトリウム水溶液を加えたコラーゲン懸濁液にOCP ( 粒径 300 ~ 500  $\mu\text{m}$ ) をOCPとコラーゲンが重量比で77:23となるようにOCP/Col懸濁液を得た。次に、得られたOCP/Col懸濁液中のコラーゲンが3, 4, 5 及び6 重量%となるようにOCP/Col 複合ゲルを得た。その後、OCP/Col 懸濁液を気体冷媒 (-80  $^{\circ}\text{C}$ ) 又は液体冷媒 (-196  $^{\circ}\text{C}$ ) に浸漬し凍結する。すなわち、本研究では、OCPとコラーゲンが重量比で77:23は不変であることから、OCP/Col 懸濁液中の Col 濃度を3 重量%として成形した試料の単位体積当たりのOCP/Col濃度を1 と定め、密度を1.0 倍、約1.3 倍、約1.7 倍、2.0 倍とし、予備凍結で用いた気相冷却 (-80  $^{\circ}\text{C}$ ) をG群、液相冷却(-196  $^{\circ}\text{C}$ : 液体窒素冷却) をL群として、8 種類の試料 (G1.0, G1.3, G1.7, G2.0, L1.0, L1.3, L1.7, L2.0) を使用した (表7)。その後に脱泡及び凍結乾燥して成形した。次いで、これを減圧下、150  $^{\circ}\text{C}$  で24時間加熱し熱脱水架橋を行った後、メスで厚さ 2.0 mm にカットし、直径 9 mm  $\times$  厚さ 2.0 mm のディスクを作製した。このディスクを動物埋植用として電子線照射したものを使用した。

表 7: OCP/Col 懸濁液中の Col 重量%と密度相対比及び試料

OCP/Col懸濁液中 のコラーゲン重量%	OCP/Col密度の 相対比	気相冷却(-80 $^{\circ}\text{C}$ ) G群	液相冷却(-196 $^{\circ}\text{C}$ ) L群
3%	1.0	G1.0	L1.0
4%	1.3	G1.3	L1.3
5%	1.7	G1.7	L1.7
6%	2.0	G2.0	L2.0

### 3.2.2 ラットへの移植方法

ラットへの移植については、12週齢の Wistar 系雄性ラット（日本SLC株式会社，静岡県浜松市）を用い，国内及び国際法の動物実験倫理指針を順守し，東北大学動物研究委員会（2014 - Biomedical Engineering Animal - 001）の承認を受け実施した。実験動物は，腹腔内メドミジン塩酸塩 (Domitor，日本製薬工業（株），郡山，福島）（0.05 mg/kg），ミダゾラム (Dormicum：アステラス製薬株式会社，東京，日本）（0.12 mg/kg）およびブトルファノール酒石酸塩 (Vetorphale: 明治製菓ファルマ株式会社，東京，日本）（0.15 mg/kg）を腹腔内に投与した。麻酔後，ラット頭蓋冠に皮膚切開・骨膜切開を加え頭蓋冠を明示した。頭蓋骨の骨膜を剥離した後，埋植試料を，OCP/Col ディスクの下面が頭蓋冠の骨面と接触するように骨膜下に設置した（図35a）。埋入後，剥離した骨膜を整復し，試料全体が骨膜で覆われた状態で縫合し（図35b），その後に皮膚を整復し，縫合を行い，手術を終了した。8種類の試料（G1.0, G1.3, G1.7, G2.0, L1.0, L1.3, L1.7, L2.0）について各 5 検体（計40検体）を使用し，観察期間は最大12週とした。

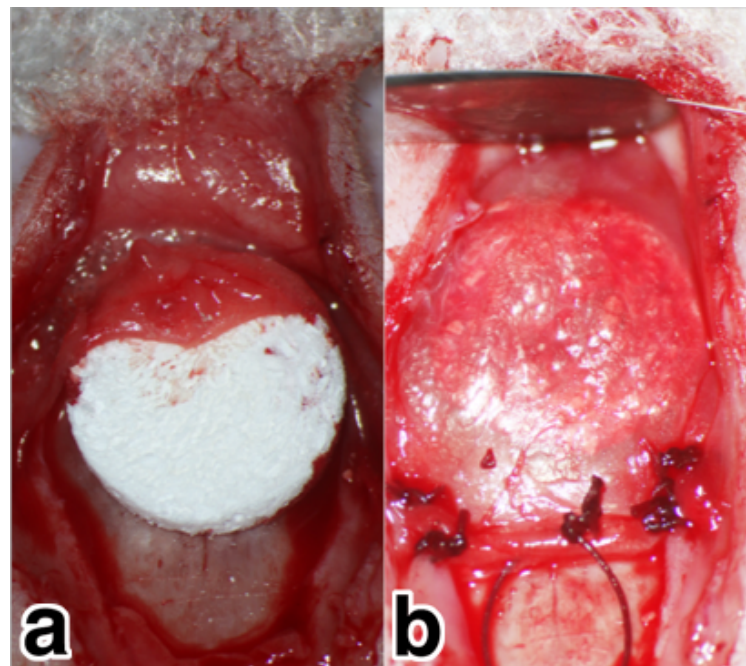


図35：試料埋入図

頭蓋骨の骨膜を剥離した後，OCP/Col を填入する (a)。  
埋植後，剥離した骨膜を復位し縫合する (b)。

### 3.2.3 マイクロ CT 撮影方法

第2章と同様に、マイクロCT (Latheta LCT-200, 日立アロカメディカル, 東京, 日本) を用いて、試料埋入後4, 12週時の放射線不透過性を調べた。撮影中の実験動物による過度の動きを制限するため、ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg) を腹腔内注射した。画像は、スライス厚 120  $\mu\text{m}$  , 画素 60  $\mu\text{m}$  , 管電圧50 kVp, 管電流500  $\mu\text{A}$ にて撮影した。埋入後12週時は、撮影後、実験動物は過量のペントバルビタールナトリウムを腹腔内注射し安楽死させた。その後、頭蓋冠および周囲組織を切除し 0.1M リン酸緩衝・4 %パラホルムアルデヒド (pH7.4) で固定した。

### 3.2.4 組織学的観察

4  $^{\circ}\text{C}$  で0.01M リン酸緩衝・10 %EDTA (pH7.4)液中で脱灰した。その後、脱灰された標本をパラフィン包埋し、ミクロトームを用いて試料の中心部を前頭断にて約 6  $\mu\text{m}$  厚に薄切した。そして各パラフィン標本につき6枚の切片をヘマトキシン・エオジン染色 (HE 染色) し、光学顕微鏡 (Leica DM2500, Leica Microsystems Japan, Tokyo, Japan) を用いて観察し、試料埋入後の組織学的変化について、組織標本の全体像及び組織標本を等領域に等分割し、下側辺縁部 (Lower Margin) を LM , 下側中央部 (Lower Central) を LC , 上側中央部 (Upper Central) を UC , 下側中央部 (Lower Central) を LC (図 36) として組織標本の詳細を観察した。

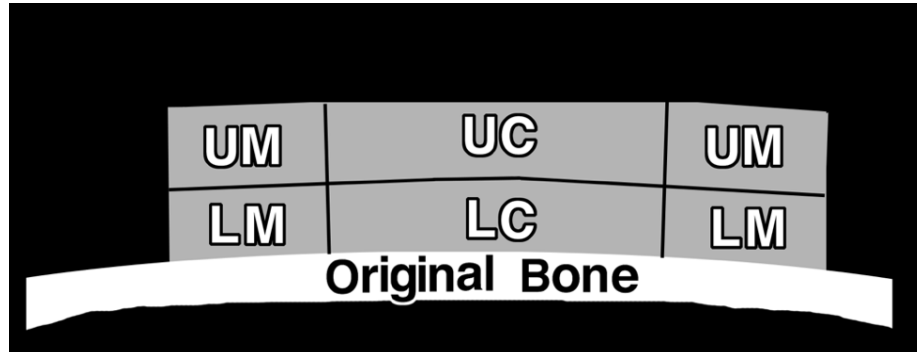


図 36: 組織標本の詳細図

組織標本の全体像及び組織標本を等領域に等分割し、下側辺縁部 (Lower Margin) を LM , 下側中央部 (Lower Central) を LC, 上側中央部 (Upper Central) を UC , 下側中央部 (Lower Central) を LC として組織標本の詳細を観察した。

(Yanagisawa T, et al., J Biomed Mater Res B Appl Biomater, in press, 2020 より引用)

### 3.2.5 組織定量的解析

#### 3.2.5.1 形状解析 (図 37)

CT 画像 (埋入後 4, 12 週時) を用い, 頭蓋骨底面から OCP/Col 上面までの高さ (H) 及び上端角度 ( $\theta, \theta'$ ) を計測した。

高さ (H) について, 試料により既存骨が吸収するなどして厚さが変化するため, このことを考慮して頭蓋骨底面から OCP/Col 上面までの高さとして定義した。

上端角度 ( $\theta, \theta'$ ) について, CT 画像 (2次元画像) の 2 つの端部 (変形前と同位置と思われる箇所) に点 (青) を取り (2 点), 各端部の近傍の扇状に広がる OCP/Col 上の 2 本の稜線上で変曲している箇所に点 (赤) を取り (各 2 点), 各端部 1 点 (青) と稜線上の変曲点 2 点 (赤) を直線 (黄) で結び, この各端部を挟んだ 2 つの直線間の角度とした。上端角度 ( $\theta, \theta'$ ) について, 試料埋入直後は  $90^\circ$  と仮定し (a), 実際に変化した角度は  $\theta - 90^\circ$  および  $\theta' - 90^\circ$  となる。

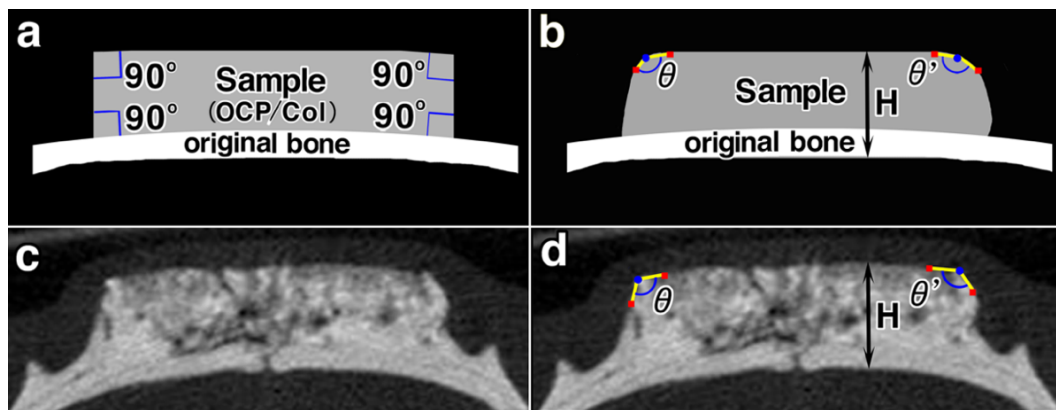


図37 : 埋入された OCP/Col の高さ と上縁角度の測定方法

CT 画像 (埋入後12週時) を用い, 頭蓋骨底面から OCP/Col 上面までの高さ (H) 及び上端角度 ( $\theta, \theta'$ ) を計測した。上端角度は, CT 画像 (2次元画像) の 2 端部 (変形前と同位置と思われる箇所) に 2 点 (青) を取り, 2 端部の各 1 点から OCP/Col の 2 つの稜線上に 2 点 (赤) を取り (各点近傍), 各 1 点 (青) とその近傍 2 点 (赤) とを直線 (黄) で結び, 直線間の角度 ( $\theta, \theta'$ ) を計測した。(a) 埋入直後の試料概略図, (b) 12 週後の試料概略図, (c) 12 週後の CT 図, (d) 12 週後の CT 図 (高さ (H), 角度 ( $\theta, \theta'$ ) 入り)

(Yanagisawa T, et al., J Biomed Mater Res B Appl Biomater, in press, 2020 より引用)

### 3.2.5.2 再生骨率 (n-Bone %)

HE 染色された切片を用いて埋入した試料のデジタル画像について、Photoshop (Adobe System Incorporated, USA)を用いて、埋入直後の試料の全体面積 (Whole area) (図38a)を仮定し、それ以外の部分を消去した。次に、新生骨 (Newly formed bone) (図 38b) 以外の部分を消去した。次に、画像ソフト (ImageJ: National institutes of helthe, Bethesda, MD, USA) を用いて、試料の全体面積 (Whole area) 及び新生骨 (Newly formed bone) を二値化し、試料の全体面積 (Whole area) を 100 % とした場合の新生骨 (Newly formed bone) の占める割合を n-Bone%として算出した。

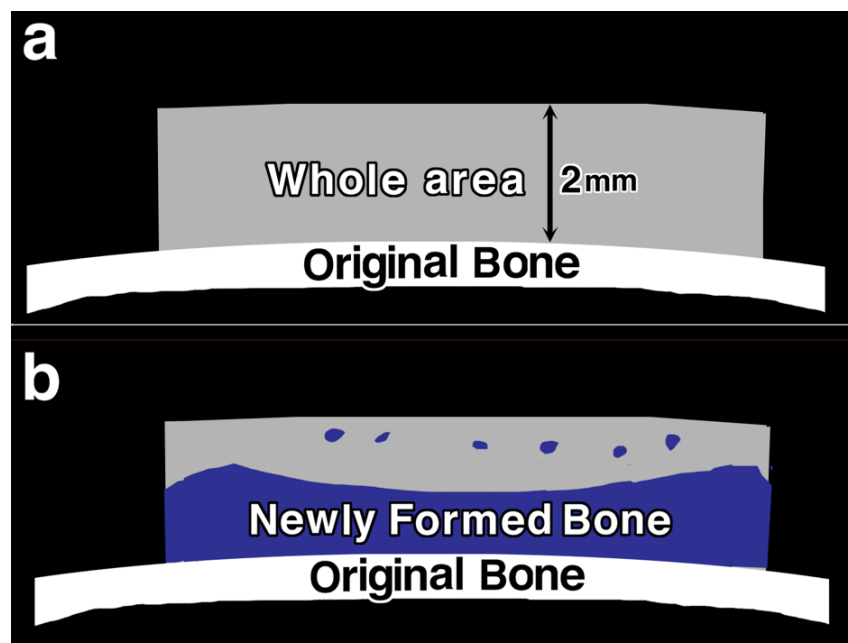


図38： n-Bone%算出の概要図

(a) 埋入直後の試料， (b) 埋入後12週の試料と新生骨

(Yanagisawa T, et al., J Biomed Mater Res B Appl Biomater, in press, 2020 より引用)

### 3.2.6 統計解析方法

統計解析は、12週時の n-Bone% について 2013 for Excel (Microsoft Co., Redmond, WA, US) を用いて行った。すべての値は平均±標準偏差(SD)として示した。カイ二乗検定より、各群が正規分布を有するかどうかを試験しBartlett検定を用いて検体間の分散の同等性を調べた。一元配置分散分析 (ANOVA) または Kruskal - Wallis 検定を用いて群間の平均を比較した。有意差は  $P < 0.05$  を基準とした。有意差が平均値で検出された場合、Tukey - Kramer または Scheffe の多重比較分析を事後検定として使用した。

## 3.3 結果

### 3.3.1 マイクロ CT 撮影 (図39, 40)

G 群 (気相冷却 (-80 °C) 群 : G1.0, G1.3, G1.7, G2.0) では, 試料埋入後 4 週, 12週ともに全ての試料埋入部に対応して X 線不透過像が顆粒状に混在しており, 12週の G2.0では, 不透過像の塊を確認した。また, OCP/Col と既存骨との界面は, 4 週では G2.0の既存骨が薄くなり, 12週では G1.7と G2.0で既存骨が薄くなっていた。

G 群の試料埋入部の高さは, 4 週後では全ての試料で埋入時から低下しており, 特に G1.0の高さが G1.3, G1.7及び G2.0と比較して低下した。一方, G1.3, G1.7及び G2.0の高さは同等であった。試料埋入後 4 週の試料上縁形状は, G1.0, G1.3及び G1.7では, 上端が判別できない程滑らかな (曲率半径の大きい) 曲線となっている。一方, G2.0は, G1.0, G1.3及び G1.7と比較して上端が判別できる滑らかな曲線 (曲率半径の小さい) となっている。G 群の12週の試料埋入部の高さは, 全ての試料で 4 週と比べて低下した。また試料上縁形状は, 全ての試料で, 4 週に比べてさらに崩れており, 上端の判別が不可能であった。

それに対して, L 群 (液相冷却 (-196 °C)(液体窒素冷却) 群: L1.0, L1.3, L1.7, L2.0) では, 埋入後 4 週において L1.0から L2.0の全ての試料について, 試料埋入部に対応して, 透過像に不透過像が顆粒状に混在していた。また, L1.0から L2.0にかけて不透過度が増しており, 辺縁部での不透過像の面積が多かった。そして, 既存骨と OCP/Col の境界が明瞭であった。試料埋入後12週では顆粒状の不透過像が塊となり, 埋入後 4 週と比較して不透過像が多く, さらに, L1.0から L2.0にかけて不透過度が増し, それらは辺縁部や輪郭が多かった。また, 既存骨側の不透過像の面積が大きく, OCP/Col と既存骨との界面が不明瞭になる傾向であった。

L 群の試料埋入部の高さは, 埋入 4 週では L1.0が L1.3, L1.7及び L2.0と比較して若干低下したが, L1.7 及び L2.0の高さは同等であった。また, 試料上端形状は, 全ての試料で上端が判別できる滑らかな曲線となっている。また, 12週の試料埋入部の高さは, 4 週と比較して L1.0は若干低下したものの, L1.3, L1.7及び L2.0は同等であった。そして, 試料上端形状は, 4 週と比較して, L1.0及び L1.3が (曲率半径の大きい) 滑らかな曲線となっていたが, L1.7及び L2.0の変化は少なかった。



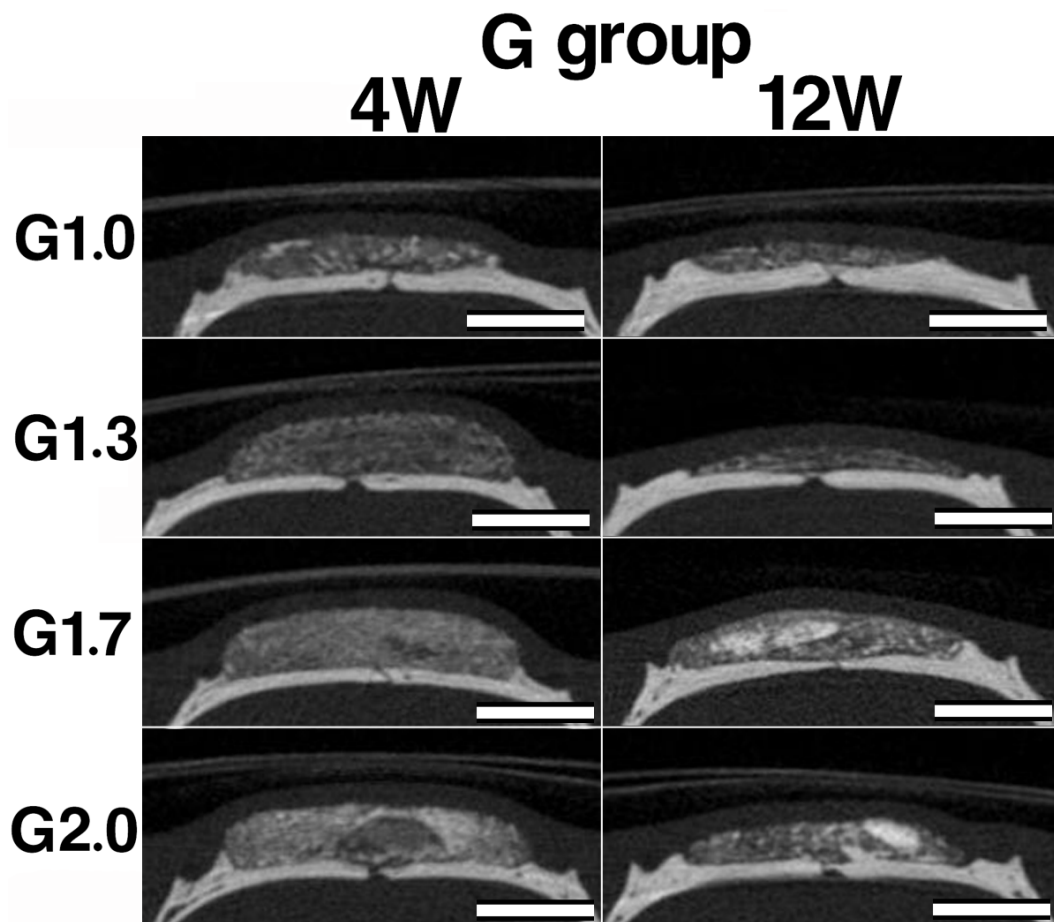


図39：G群の埋入後4，12週時のマイクロCT像

図の上側は皮膚側を示し下側は既存骨側を示す。

X線不透過度に関して，4週及び12週において不透過像が顆粒状に存在していた。全ての試料について埋入時から低下し，エッジに関して，滑らかな（曲率半径の大きい）曲線となっている。G1.7及びG2.0では既存骨が薄くなっていた。

バー：4 mm

（全試料の測定結果については3.6に掲載した（図57～図60）。）

（Yanagisawa T, et al., J Biomed Mater Res B Appl Biomater, in press, 2020 より引用）

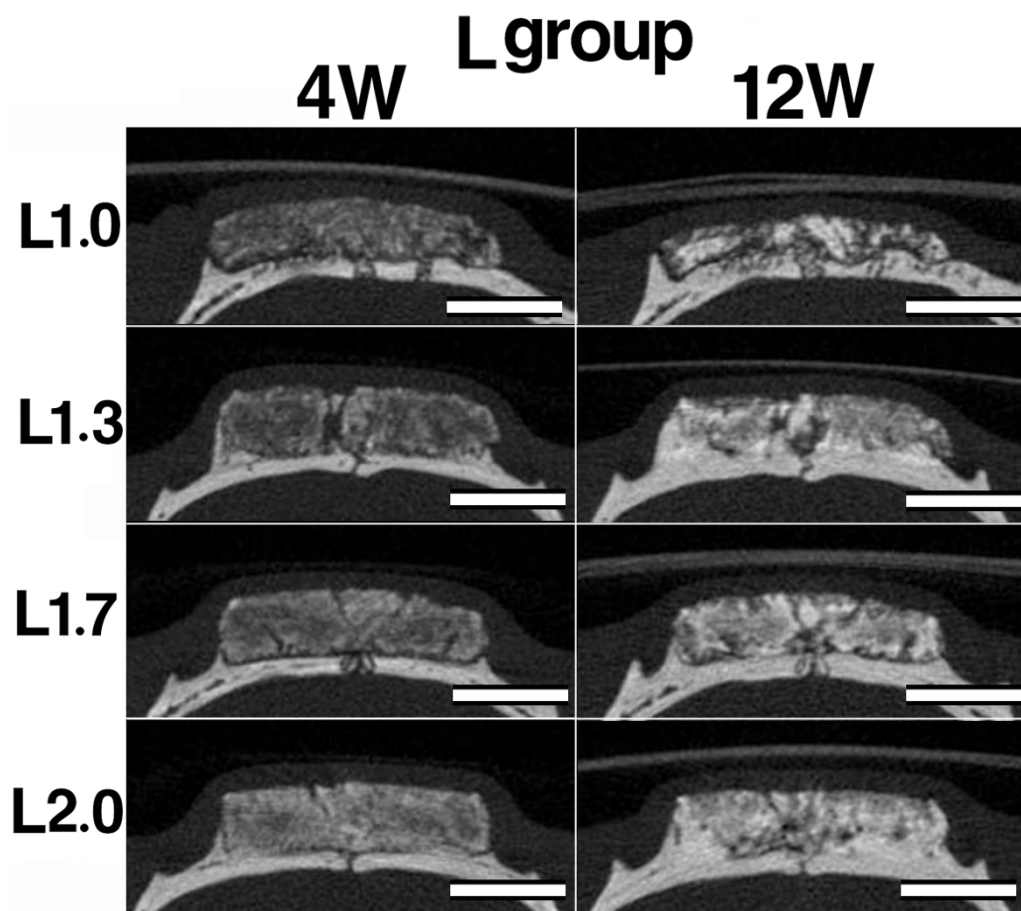


図40：L群の埋入後4，12週時のマイクロCT像

図の上側は皮膚側を示し下側は既存骨側を示す。

X線不透過度に関して，4週及び12週において不透過像が顆粒状に存在していた。また，L1.0からL2.0にかけて不透過度が増しており，辺縁部での不透過像の面積が多かった。既存骨とOCP/Colの境界が明瞭であった。12週では，高さに関して，L1.0は若干低下したが，L1.3，L1.7，L2.0は保持された。エッジに関して，4週と比較して，L1.0及びL1.3が（曲率半径の大きい）滑らかな曲線となっていた。L1.7及びL2.0は同等であった。バー：4 mm。

（全試料の測定結果については3.6に掲載した（図61～図64）。）

（Yanagisawa T, et al., J Biomed Mater Res B Appl Biomater, in press, 2020 より引用）

### 3.3.2 定量解析（高さ）(図41～ 44)

G群では，試料埋入後4週の試料の平均値は $2.2 \pm 0.1$  mm (20サンプル)であり，有意差がG1.0とG1.7で認められた。試料埋入後12週の試料の平均値は $1.6 \pm 0.1$  mm (20サンプル)であり，優位差は認められなかった。4週と12週との比較は，有意差がG1.3，G1.7及びG2.0で認められた（図41）。

L群では，試料埋入後4週の試料の平均値は $2.9 \pm 0.1$  mm (20サンプル)であり，優位差は認められなかった。試料埋入後12週の試料の平均値は平均 $2.7 \pm 0.1$  mm (20サンプル)であり，優位差は認められなかった。4週と12週との比較でも優位差は認められなかったが，4週に比べて12週は低下したが，L1.3, L1.7 及びL2.0は低下が少なかった（図42）。

4週について，有意差がG1.0とL1.0，G1.3とL1.3，G1.7とL1.7及びG2.0とL2.0で認められた（図43）。12週について，同濃度のG群とL群の高さについて，有意差がG1.3とL1.3，G1.7とL1.7及びG2.0とL2.0で認められ，4週と比較してG群とL群の差が広がった（図44）。

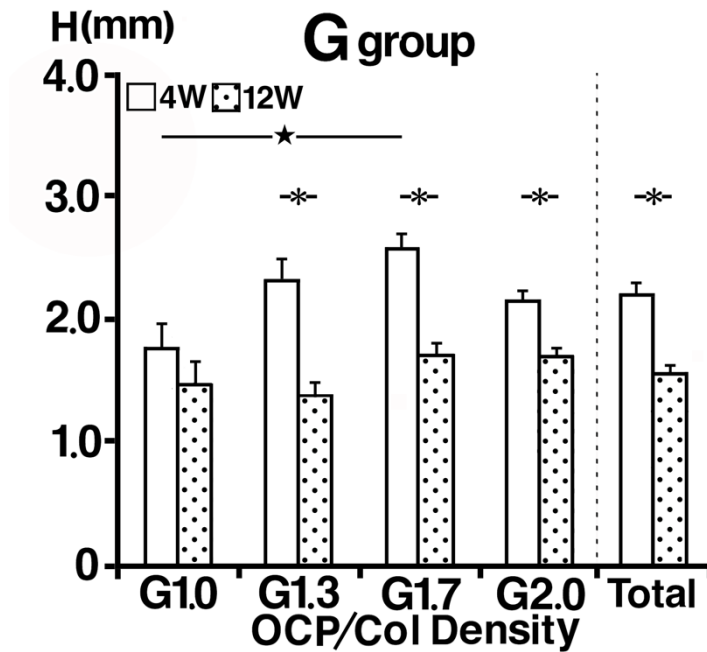


図 41: 4 週における CT 画像に基づく定量解析（高さ）

G群について、埋入後 4 週では有意差が G1.0 と G1.7 で認められた（\* :  $P < 0.05$ ）。4 週時と 12 週時との比較は、有意差が G1.3, G1.7 及び G2.0 で認められた。

(Yanagisawa T, et al., J Biomed Mater Res B Appl Biomater, in press, 2020 より引用)

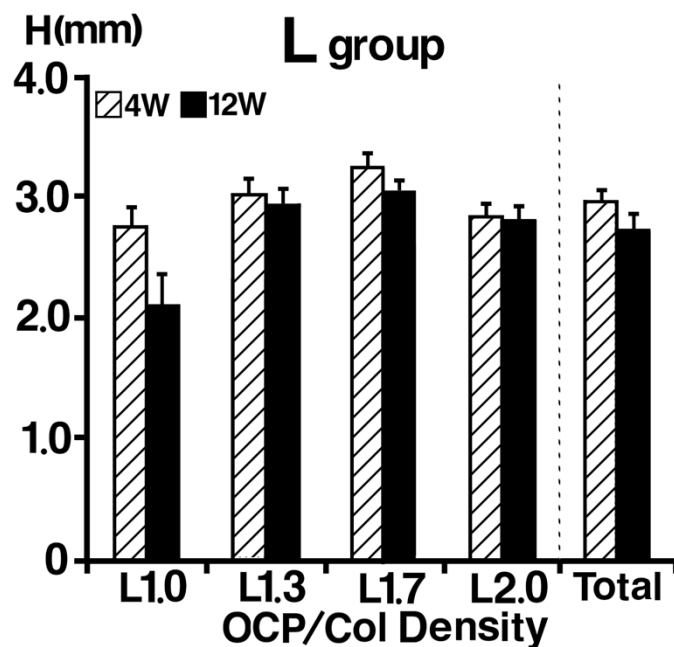


図 42: 12 週における CT 画像に基づく定量解析（高さ）

L群について、埋入後 4 週及び 12 週時において、優位差は認められなかった。4 週と 12 週との比較でも優位差は認められなかったが、4 週に比べて 12 週は低下したが、L1.3, L1.7 及び L2.0 は低下が少なかった。

(Yanagisawa T, et al., J Biomed Mater Res B Appl Biomater, in press, 2020 より引用)

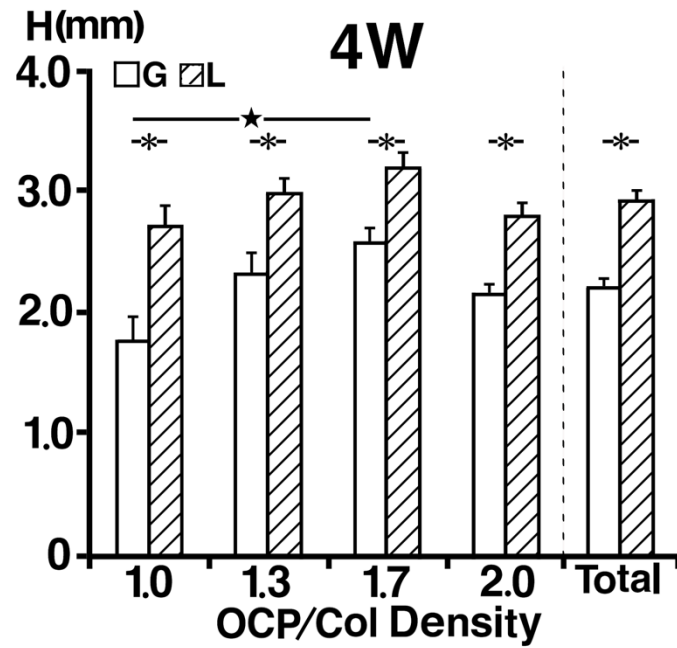


図 43: G 群における CT 画像に基づく定量解析（高さ）  
 埋入後 4 週について，同濃度の G 群と L 群の高さについて，有意差が認められた（\*：P < 0.05）。  
 （Yanagisawa T, et al., J Biomed Mater Res B Appl Biomater, in press, 2020 より引用）

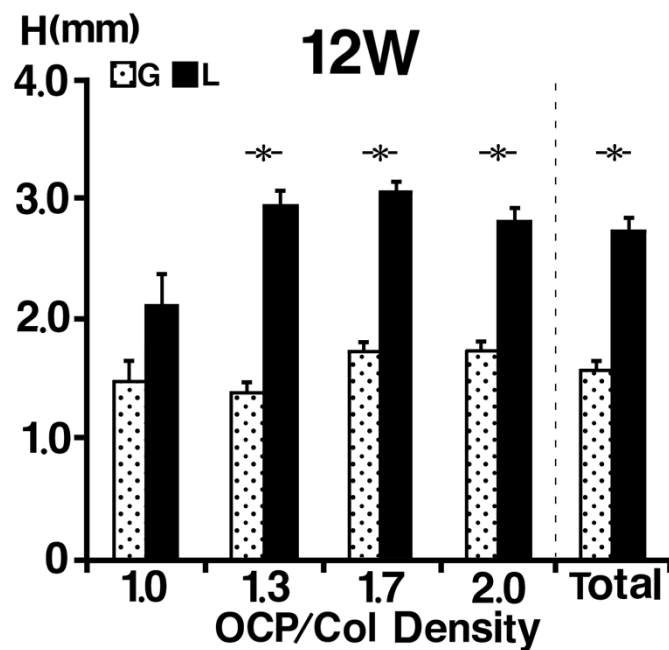


図 44: CT 画像に基づく定量解析（高さ）  
 埋入後 12 週について，同濃度において，G 群より L 群の方が高かった（\*：P < 0.05）。  
 （Yanagisawa T, et al., J Biomed Mater Res B Appl Biomater, in press, 2020 より引用）

### 3.3.3 定量解析（角度）（図 45）

G群は、変形が大きく計測不能であったため、L群（L1.0, L1.3, L1.7, L2.0）のみ計測した。4週の平均値は $126 \pm 2^\circ$ であり、有意差は認められなかった。12週の平均値は $136 \pm 3^\circ$ であり、有意差はL1.3とL2.0で認められた。4週及び12週共に、L1.3以上ではOCP/Col濃度が増加すると変形量が小なる傾向であった。4週と12週とでは有意差が認められなかったが、全試料において4週と比べて12週は角度が大きくなる傾向であった。

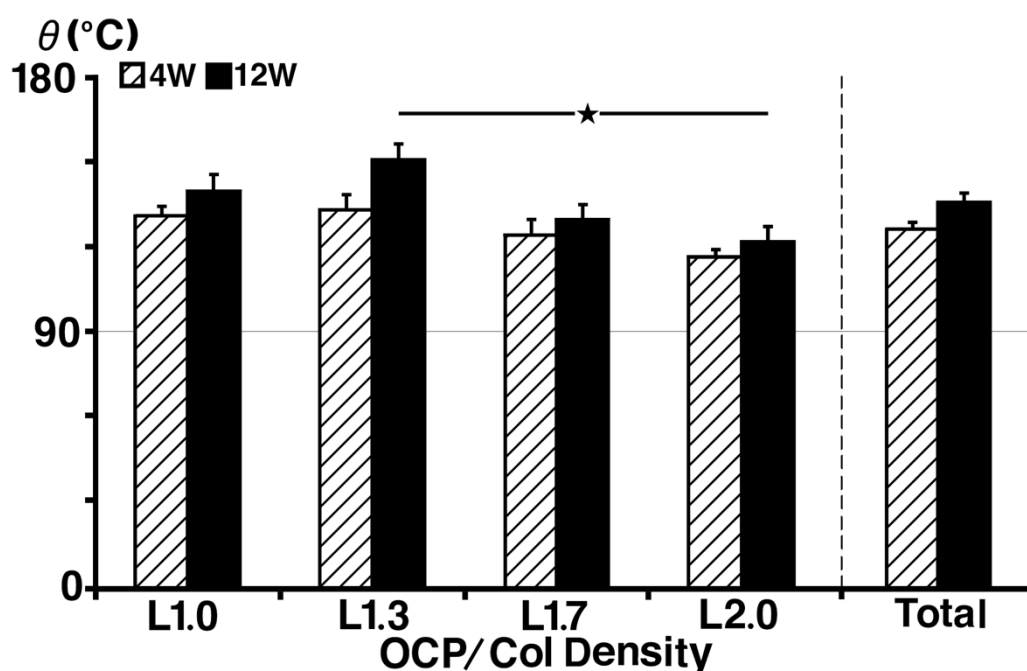


図45： CT画像に基づく定量解析（高さ）

埋入後4週では有意差は認められなかった。埋入後12週では、有意差はL1.3とL2.0で認められた（★：P < 0.05）。4週と12週とでは有意差が認められなかったが、全試料において4週と比べて12週は角度が大きくなる傾向であった。

（Yanagisawa T, et al., J Biomed Mater Res B Appl Biomater, in press, 2020 より引用）

### 3.3.4 組織学的観察

G群とL群とのそれぞれについて全体像を比較した(図46, 47)。全ての試料において、新生骨が辺縁部で見られた。辺縁部以外の既存骨側では、G1.0において新生骨が少量形成されていたが、G1.3, G1.7及びG2.0ではほとんど形成されていなかった。G群について、G1.0及びG1.3は、G1.7及びG2.0と比べてOCP/Colの高さが低下した。G1.7及びG2.0では既存骨が菲薄していた。L群について、L1.0からL2.0の全ての試料において、辺縁部において、新生骨は既存骨側から皮膚側に向けて骨膜に沿って形成されていた。L1.7及びL2.0は新生骨が皮膚側付近まで形成されていた。また中央部においても、新生骨が既存骨側に形成されていた。辺縁部及び中央部において、L1.0からL2.0に向けてOCP/Colの密度が増すに連れて新生骨形成量が多かった。多核巨細胞が皮膚側に少数存在していた。コラーゲンは分解されておらず、多核巨細胞以外の細胞は確認できなかった。L群について、L1.0は高さが低下したが、L1.3, L1.7及びL2.0は高さが保持された。

G群とL群との拡大図を観察した(図48～55)。代表図としてG2.0, L2.0の上側辺縁部(Upper Marginal area: UM), 下側辺縁部(Lower Marginal area: LM), 上側中央部(Upper Central area: UC)及び中央上部(Lower Central area: LC)を掲載した。G2.0について、LMにおいて新生骨が形成されている(図48)。LCにおいて、既存骨が菲薄している(図49)。UCにおいてほとんど新生骨が形成されていない(図50)。さらに、UCでは、多くの多核巨細胞(MNGCs)が存在し、埋入した試料のコラーゲンが分解していた(図51)。L2.0について、LMにおいて、新生骨が既存骨側から形成されておりG群と比べて形成量が多い(図52)。LCにおいて、新生骨が既存骨側から形成されている(図53)。UCにおいて、新生骨が既存骨側でも少量形成されている(図54)。UCにおいて、埋入した試料におけるコラーゲンのフレームワークが残っており、多核巨細胞が確認されたが、G群と比べて著しく少なかった(図55)。

## G group (12W)

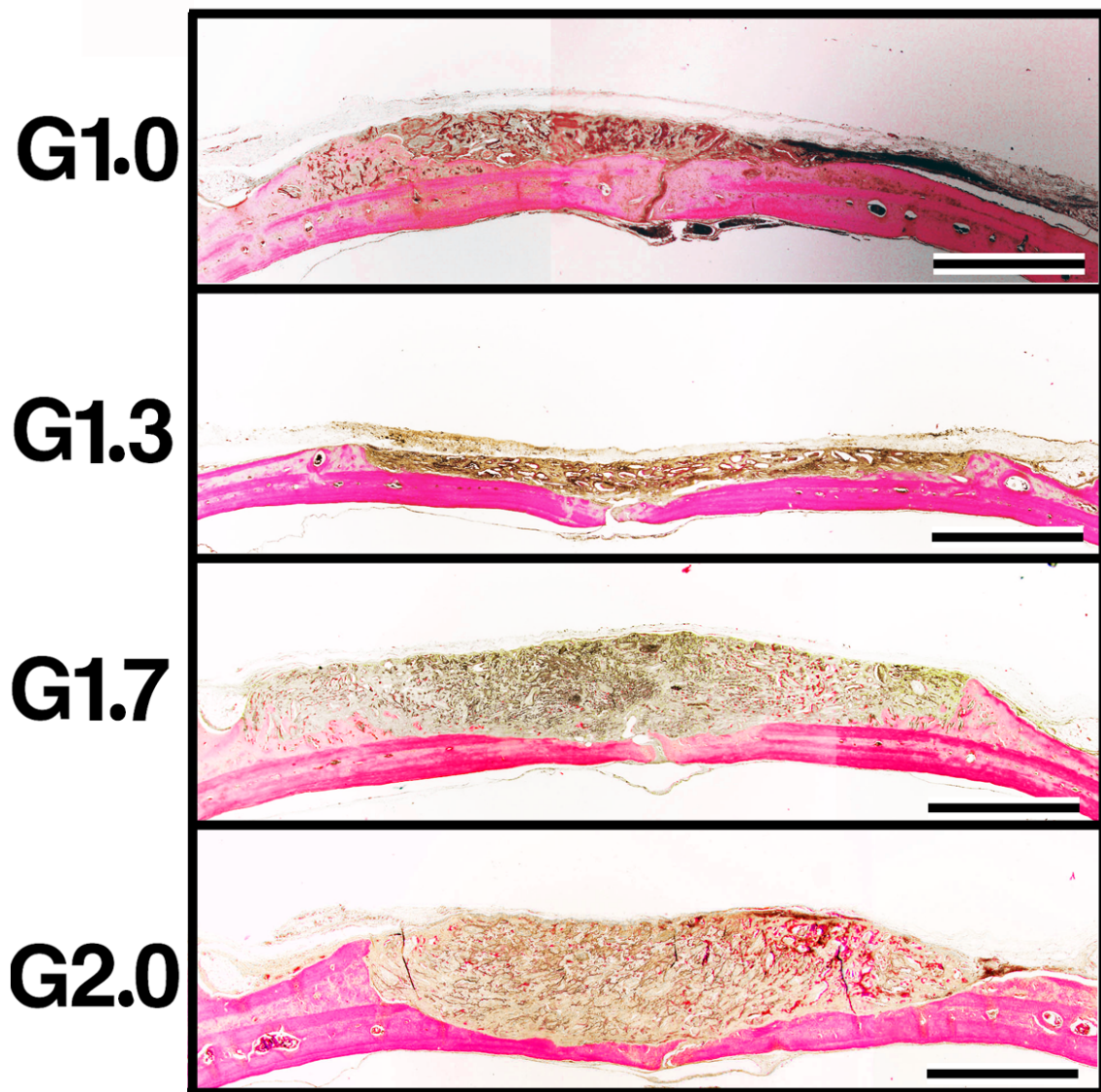


図46：G群の組織学的観察（全体）

全ての試料において、新生骨が辺縁部で見られた。G1.0及びG1.3は、G1.7及びG2.0と比べてOCP/Colの高さが低下した。G1.7及びG2.0では既存骨が菲薄していた。バー：3 mm

（全試料の測定結果については 3.6 に掲載した（図65～図 68）。）

（Yanagisawa T, et al., J Biomed Mater Res B Appl Biomater, in press, 2020 より引用）



## L group(12W)

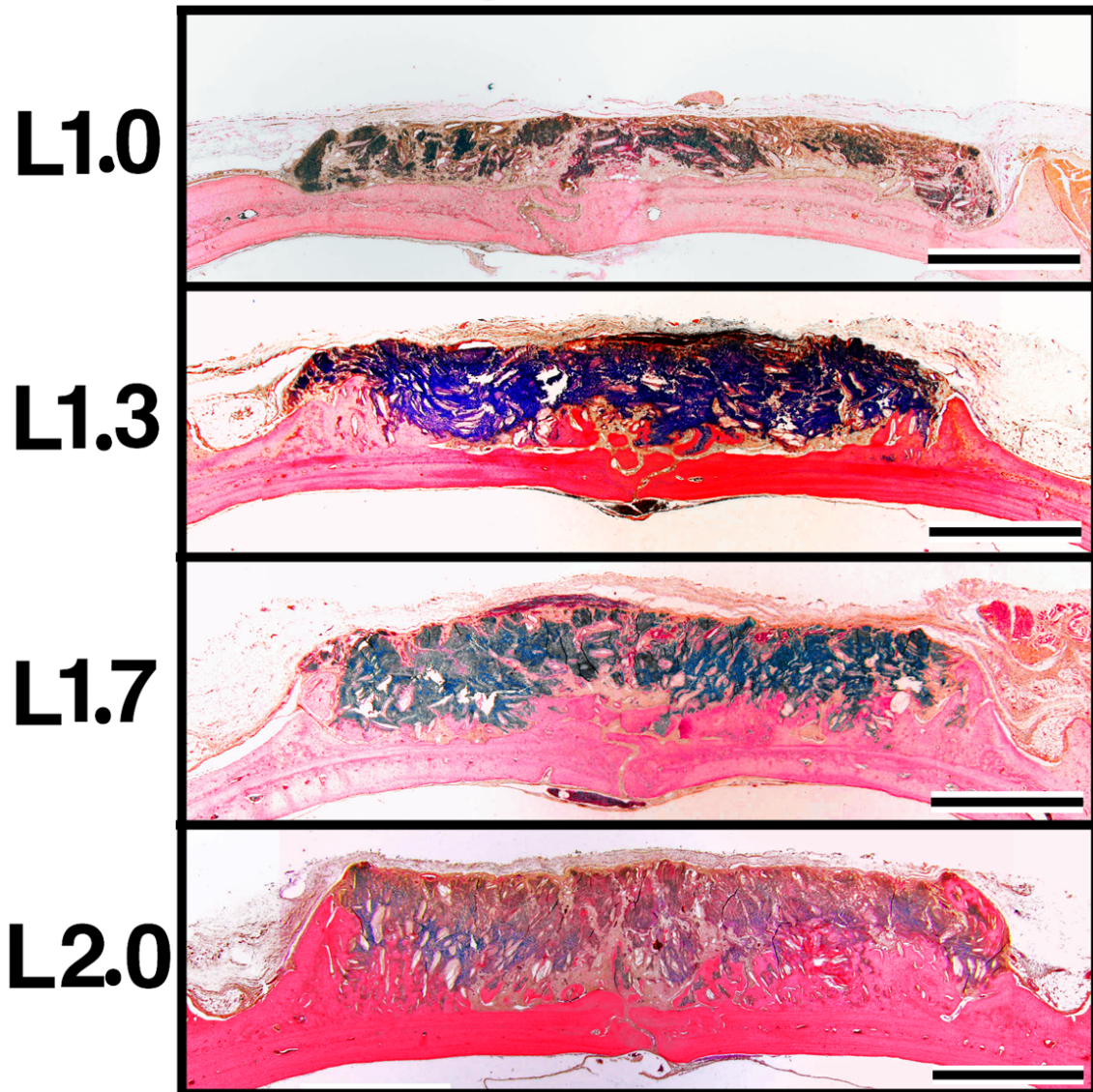


図47：L群の組織学的観察（全体）

既存骨側と辺縁部において、新生骨が形成され、OCP/Colの密度が増すにつれて新生骨形成量が多くなった。バー：3 mm

（全試料の測定結果については 3.6 に掲載した（図69～図 72）。）

（Yanagisawa T, et al., J Biomed Mater Res B Appl Biomater, in press, 2020 より引用）

## LM(G2.0)



図48：組織学的観察(LM (G2.0) 拡大図)

辺縁部において新生骨が形成されている。

バー：200  $\mu\text{m}$  , B: 新生骨

(Yanagisawa T, et al., J Biomed Mater Res B Appl Biomater, in press, 2020 より引用)

## LC (G2.0)

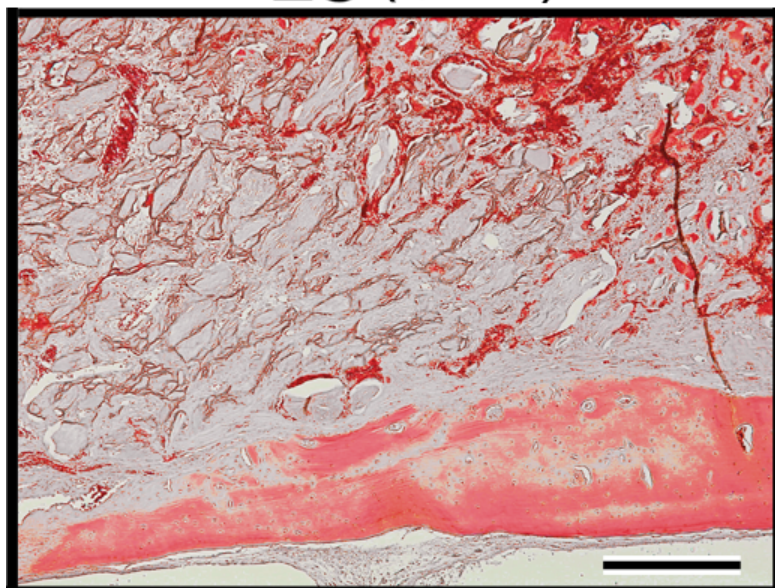


図49：組織学的観察(LC (G2.0) 拡大図)

中央下部において、既存骨が菲薄している。

バー：200  $\mu\text{m}$  , B: 新生骨

(Yanagisawa T, et al., J Biomed Mater Res B Appl Biomater, in press, 2020 より引用)



## UC(G2.0)

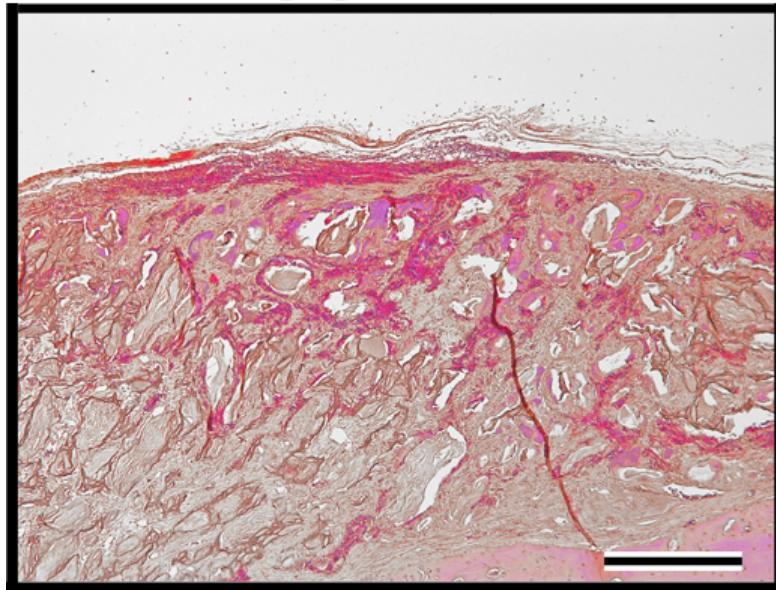


図50：組織学的観察(UC (G2.0) 拡大図)

中央上部においてほとんど新生骨が形成されていない。バー：200  $\mu\text{m}$

(Yanagisawa T, et al., J Biomed Mater Res B Appl Biomater, in press, 2020 より引用)

## UC(G2.0)

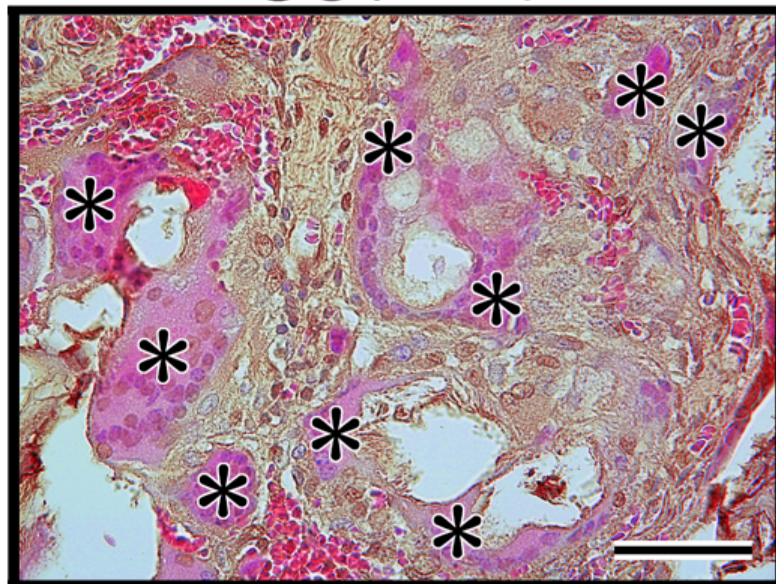


図51：組織学的観察 (UC (G2.0) 拡大図)

多数の多核巨細胞(MNGCs)が確認され，コラーゲンは分解していた。

バー：50  $\mu\text{m}$  (d, h)， アスタリスク：MNGCs

(Yanagisawa T, et al., J Biomed Mater Res B Appl Biomater, in press, 2020 より引用)

## LM(L2.0)

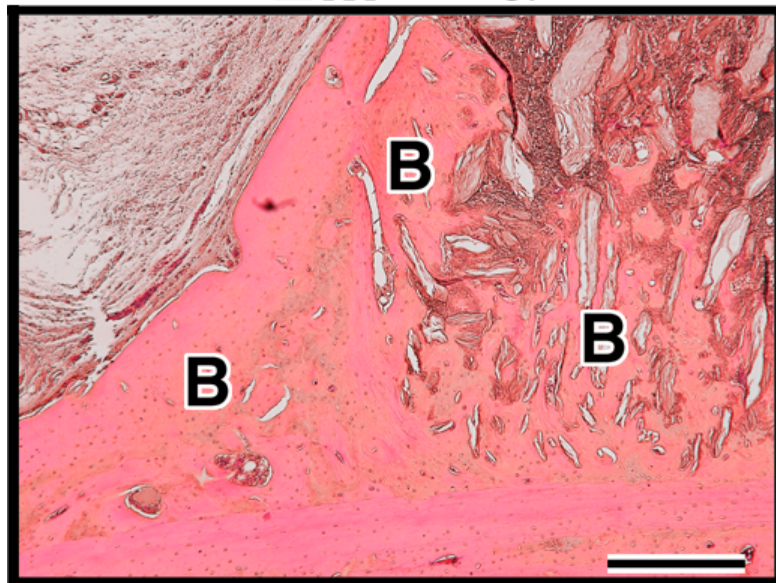


図52：組織学的観察(LM (L2.0) 拡大図)

辺縁部において，新生骨が既存骨側から形成されている。

バー：200  $\mu\text{m}$ ， B: 新生骨

(Yanagisawa T, et al., J Biomed Mater Res B Appl Biomater, in press, 2020 より引用)

## LC(L2.0)

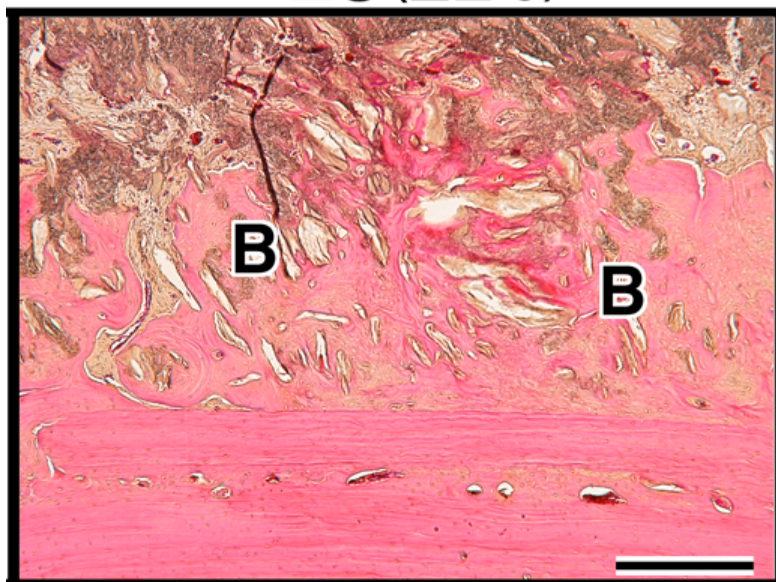


図53：組織学的観察 (LC (L2.0) 拡大図)

LC において既存骨側で新生骨が多く形成されている。

バー：200  $\mu\text{m}$ ， B: 新生骨

(Yanagisawa T, et al., J Biomed Mater Res B Appl Biomater, in press, 2020 より引用)



## UC (L2.0)

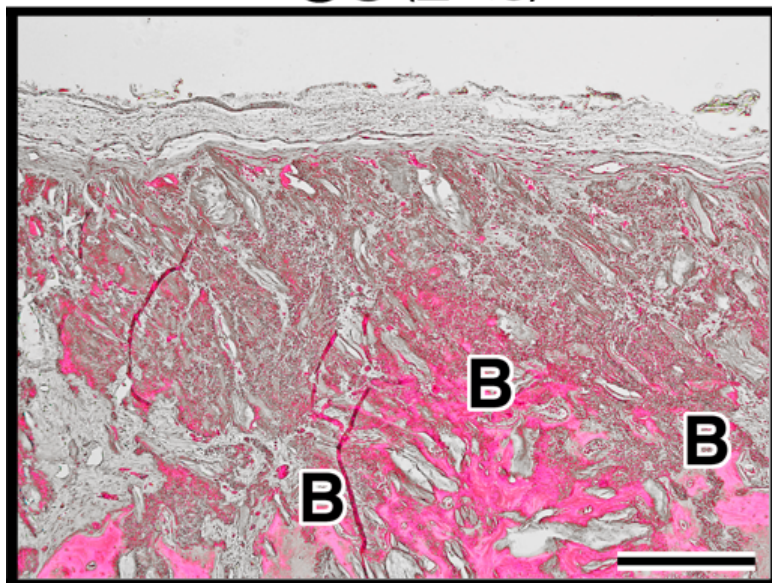


図54：組織学的観察(UC (L2.0) 拡大図)

新生骨は皮膚側でも観察された。バー：200  $\mu\text{m}$ ， B: 新生骨

(Yanagisawa T, et al., J Biomed Mater Res B Appl Biomater, in press, 2020 より引用)

## UC(L2.0)

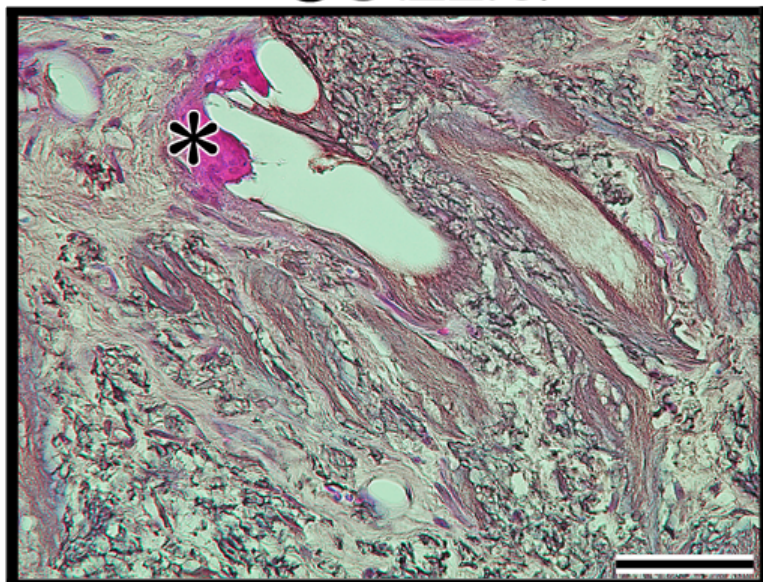


図55：組織学的観察(UC (L2.0) 拡大図)

OCP/Collagenのフレームワークが残り，少量の多核巨細胞が観察された。

バー：50  $\mu\text{m}$ ， アスタリスク: MNGCs

(Yanagisawa T, et al., J Biomed Mater Res B Appl Biomater, in press, 2020 より引用)

### 3.3.5 組織学的形態計測による定量解析 (図 56)

n-Bone%に関して、G群(G1.0, G1.3, G1.7, G2.0)とL群(L1.0, L1.3, L1.7, L2.0)においてそれぞれ多重比較検定を行い、OCP/Col濃度が同一の試料ではG群とL群(例えばG1.0(4W)とL1.0(4W))とで比較した。

G群のn-Bone%は、G1.0, G1.3, G1.7及びG2.0について、それぞれ  $17.7 \pm 4.0\%$ 、 $5.1 \pm 0.6\%$ 、 $12.9 \pm 1.9\%$  及び  $7.4 \pm 1.3\%$  であり、有意差は認められなかった。L群のn-Bone%は、L1.0, L1.3, L1.7 及び L2.0について、それぞれ  $9.7 \pm 3.6\%$ 、 $17.1 \pm 1.9\%$ 、 $24.5 \pm 4.0\%$  及び  $40.2 \pm 4.8\%$  であり、有意差は認められなかった。L群はOCP/Col濃度が増加するに従いn-Bone%が増加した。G群とL群との有意差は、G1.3とL1.3、G1.7とL1.7及びG2.0とL2.0の間で認められた。

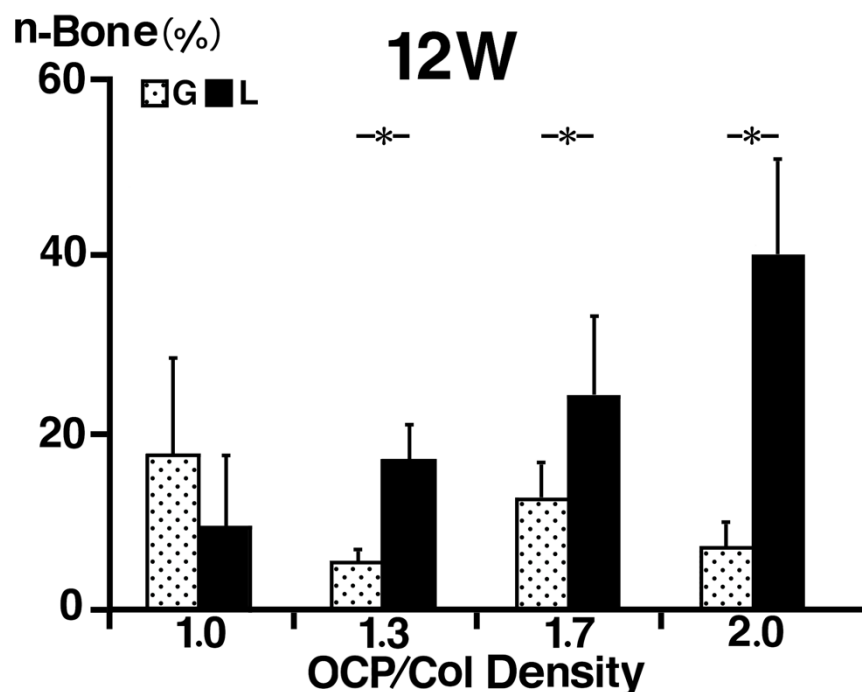


図 56: 組織学的形態計測による定量解析 (n-Bone%)

G群のn-Bone%は、G1.0, G1.7, G2.0, G1.7の順で高く、有意差は認められなかった。L群のn-Bone%は、L2.0, L1.7, L1.3, L1.0の順で高く、有意差は認められなかった。L群はOCP/Col濃度が増加するに従いn-Bone%が増加した。G群とL群との有意差は、G1.3とL1.3、G1.7とL1.7及びG2.0とL2.0の間で認められた(\*:  $P < 0.05$ )。

(Yanagisawa T, et al., J Biomed Mater Res B Appl Biomater, in press, 2020 より引用)

### 3.4 考察

本研究ではL群（液相冷却(-196℃)群）のOCP/Colは高さや形状が保持され、垂直的骨造成が達成されたことが証明された。一方、G群（気相冷却(-80℃)群）のOCP/Colは高さや形状が保持できず、垂直的骨造成が達成できなかった。これらのことは、L群とG群による予備凍結を比較することによりOCP/Colへの予備凍結温度は、骨再生能と形状維持する能力に影響することを証明した。

同一のOCP/Col濃度におけるG群とL群との埋入試料の高さでは、4週ではL群はG群に比べて有意に高さを保持し（図43）、12週では4週よりもL群とG群との高さの差がさらに広がった（図44）。組織観察から、12週では、G群は皮膚側に多核巨細胞が多数存在した（図51）のに対してL群はほとんど存在しなかった（図55）。過去の文献から、静的な圧力がかかる環境では、圧力がない場合と比べてTRAP陽性の多核の細胞が増殖することが確認され（110）、負荷が大きい場合にはOCP/Colが多核巨細胞により試料が吸収されること（55）が報告されている。また、人工関節で用いられる超高分子量ポリエチレンの摩耗粉が異物としてマクロファージによって貪食され、同時に炎症性サイトカインを分泌し、破骨細胞の形成・活性化による骨吸収が起こること（111）や、貪食できない大きな異物粒子の存在下では、マクロファージは融合し多核の異物巨細胞になることが報告されている（112）。このことから、G群は生体に異物として認識されたため、試料埋入から長期間経過しても多核巨細胞が多く存在し、試料が無くなるまで試料の吸収が進むと考えられる。

これらより、G群は試料の吸収量が多かったため高さが低下し、L群は試料の吸収量が少なかったため高さの低下が抑制されたと考えられる。前述と関係して過去の文献では、ラットの膝から半月板を摘出し、液体窒素により細胞を取り除いた後に再移植すると免疫反応が低下するという報告（113）がある。細胞を除去した試料がコラーゲンであると考えると、液体窒素で冷却されると免疫反応が低下すると考えられるため、L群は免疫反応と関係のある多核巨細胞が少なくなったと考えられる。

次に、G群の同一期間におけるOCP/Col濃度（1.0～2.0）と高さの関係についてみると、4週時ではOCP/Col濃度による明確な違いはなかったが、12週時ではOCP/Col濃度が高い試料は高さが保持された（図41）。過去の報告では、スキャホールドの密度を増加させた場合に強度が高くなっている報告がある（108, 109）。OCP/Col濃度の増加に伴い単位容積当たりの密度が上がり強度が増したことで、OCPがアパタイトに変わり硬度が増したことで（114）から、多核巨細胞による吸収や皮膚側からの外力（メカニカルストレス）を受けても一定の高さが保たれたと考えられる。また、CT画像よりG1.7とG2.0は既存骨上の既存骨と接しない箇所に不透過像が確認された（図39）が、組織写真では不透過像の箇所では新生骨は存在しない（図46）。不透過像に関しては、OCPが埋入された位置に形成された新生骨と、細胞が関与しないでOCPから転化したアパタイトであることが知られている（47）。したがって、CT画像における不透過像は新生骨と一致しない場合がある。また、組織写真より、G1.7とG2.0は既存骨が菲薄している（図46）。なお、過去の文献より、ラットの頭蓋骨上の骨膜下に埋入したHApにより、既存骨が吸収されたとの報告（115）がある。これらより不透過像がアパタイトであると考ええると、OCPから転化したアパタイトの影響により既存骨が菲薄したと考えられる。



同様にL群の同一期間においてOCP/Col濃度と高さ上縁の変形量の関係についてみると、4週時においてはG群と同様にOCP/Col濃度による明確な違いはなかったが、12週時にはL1.3、L1.7及びL2.0は高さが維持され、L1.0は高さが低下した(図42)。また、上縁の変形は、L1.3以上でOCP/Col濃度が増すにつれて変形量が小さくなった(図45)。これらは、G群と同様に、OCP/Col濃度が増加することにより試料の強度が高くなること、OCPがアパタイトに変わり硬度が増したことから、L1.3、L1.7及びL2.0は皮膚側からの外力(メカニカルストレス)を受けても、高さが保たれ、OCP/Col濃度が増すにつれて変形が抑制されたと考えられる。

12週時の同濃度のOCP/Col濃度のL群とG群の新生骨形成量を比較すると、OCP/Col濃度が1.3以上ではL群はG群と比べて新生骨形成量が多かった。L群の新生骨量が多かった理由の1つは、予備凍結で液体窒素を用いたためと考えられる。過去の文献より、家兎の半月板を摘出して液体窒素冷却を行い、細胞を取り除いた後に再移植した試料は免疫反応が抑えられ、組織を作る細胞が増殖したとの報告がある(116)。このことから、L群は多核巨細胞の増殖が抑えられつつ、OCPを主としてOCP/Colが徐々に骨に置換したと考えられる。

次に、G群の12週時の新生骨についてみると、新生骨は、辺縁部において形成され、中央部ではG1.0のみ既存骨側に新生骨が形成されていた。辺縁部に新生骨が形成された理由として血液等を介してOCP/Colに侵入した骨前駆体が分化して骨形成細胞により骨膜周縁において新生骨形成が促進したと考えられる。また、辺縁部以外の領域で多核巨細胞が多数確認されたことから骨形成のための必要な足場が不足し、骨が形成されにくかったと考えられる。

L群の12週時の新生骨についてみると、新生骨は、辺縁部において全ての試料で新生骨が形成されたが、中央部の既存骨側にも新生骨が形成されている。また、新生骨形成量がOCP/Col濃度に依存していた。辺縁部における新生骨形成はG群と同様に血液等を介してOCP/Colに侵入した骨形成細胞により骨膜周縁において新生骨形成が促進したと考えられる。一方、既存骨側の新生骨形成に関連して、既存骨の骨芽細胞やbone lining cellsや骨形成前駆細胞がOCPに作用し、新生骨形成に関与することが述べられている(102)。このことから、既存骨の骨形成細胞がOCP/Colと相互作用することにより、既存骨側で新生骨形成が促進されたと考えられる。さらに、組織写真より、新生骨以外のコラーゲンとOCP又はOCPから変化したアパタイトの混在する部分に細胞があまり確認できない(図52)。過去の文献では、ヒト由来の皮膚組織を窒素冷却した試料をラットの皮下に注入した結果、炎症が少なく、コラーゲンマトリクスが保持され、宿主細胞が増加した(107)という報告がある。加えて、過去の文献より液体窒素冷却を行うと、酸性環境においてタンパク質(乾燥卵白やラットの腱から取り出したタイプIコラーゲン)の変性がなく、それ以上の温度ではタンパク質の変性が起きるという報告(117, 118)から、L群はコラーゲンが保持され、G群はコラーゲンが変性した可能性がある。また、液体窒素冷却を行うとリン酸カルシウム系材料及びコラーゲンの空孔サイズが小さくなること(104, 105)から、L群も同様に空孔サイズが小さくなり、多核巨細胞等の細胞のOCP/Col内への侵入が抑制された可能性が考えられる。これらより、L群は生体にとって異物と見なされず、多核巨細胞の出現を抑制でき、新生骨形成を促進するための足場が保持されたと考えられる。

このように、本研究は骨形成に必要な足場が保持されており、新生骨は経時的に既存骨側からの形成が期待される。また、骨形成がOCPの密度が依存すること、コラーゲンが骨芽細胞の増殖と付着を促進させること(58)から、新生骨形成量がOCP/Col濃度に依存したと考えられる。これらの結果より、液相による予備凍結を行うことで、OCP/Col単独での垂直的骨造成を達成した。前記条件の下でOCP/Colの濃度を増加させることにより、新生骨が増加し形状が維持された。

### 3.5 結論

本研究では、OCP/Colを予備凍結において液体窒素冷却をすることにより、多核巨細胞による吸収を抑制し、骨形成に必要な足場を確保して形状を保持した。また、骨形成に必要な足場が確保されたためOCP/Col濃度を増加させることにより、さらに形状が安定し、新生骨形成量も増加した。以上より、垂直的骨造成しうる可能性が示唆された。この処置には細胞やシグナル分子を用いる必要がなく、将来、垂直的骨造成を達成することを可能とする技術であると考えられる。

### 3.6 第3章の測定結果(全試料)

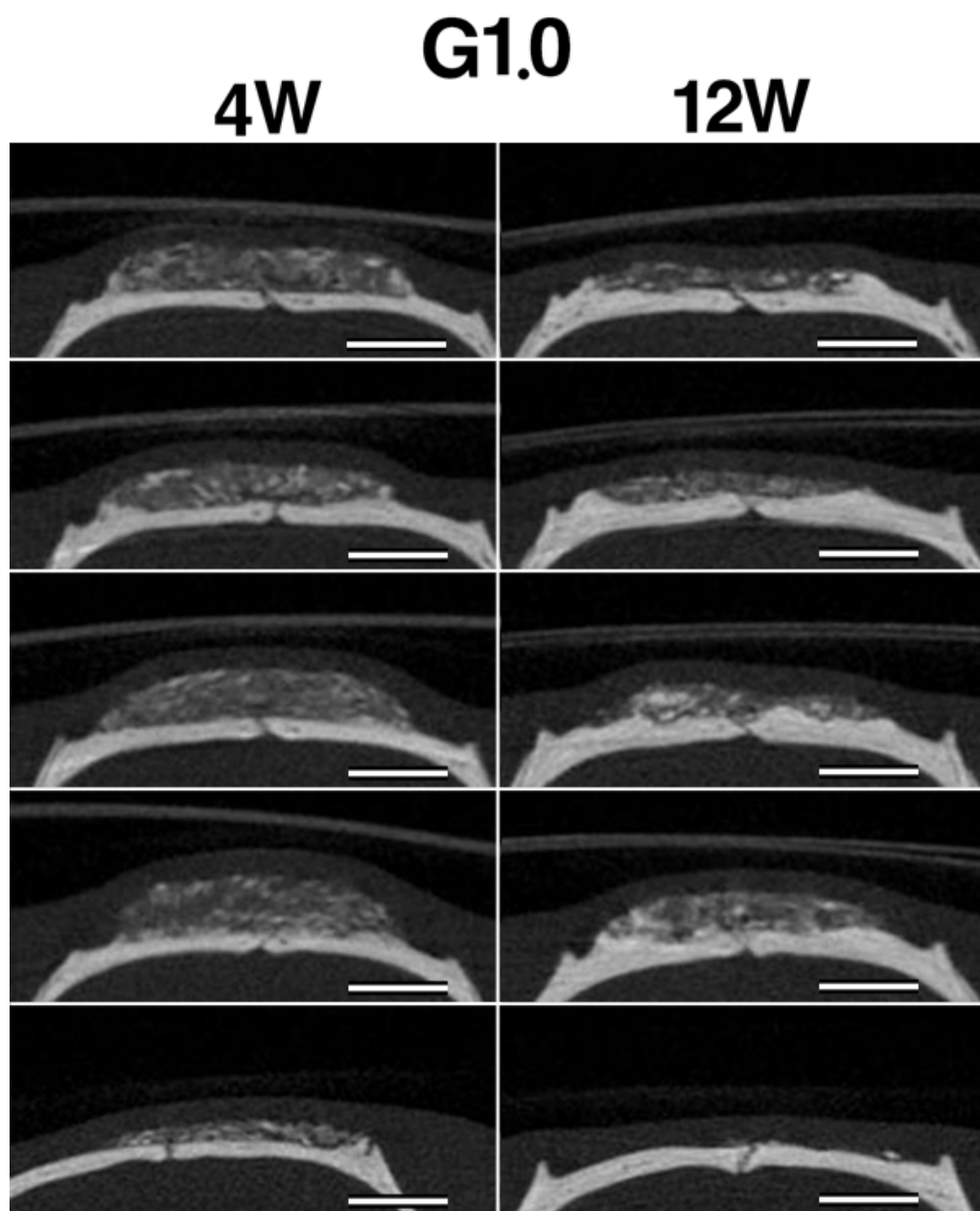


図57：G1.0の埋入後4，12週時のマイクロCT像

図の上側は皮膚側を示し下側は既存骨側を示す。左列は4週時，右列は12週時の測定結果を示す。X線不透過度に関して，4週及び12週において不透過像が顆粒状に存在していた。全ての試料について埋入時から低下し，エッジに関して，滑らかな（曲率半径の大きい）曲線となっている。バー：3 mm

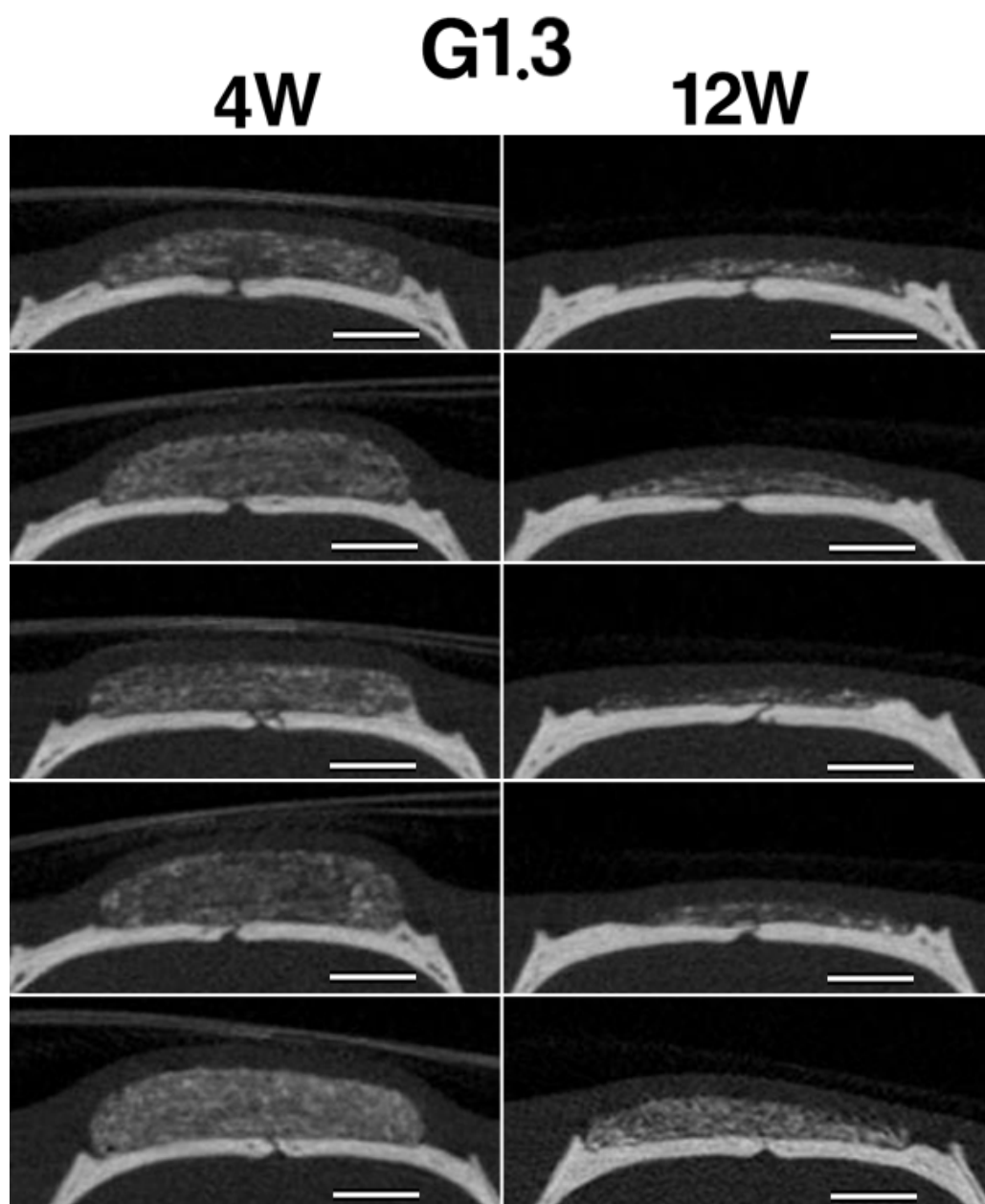


図58：G1.3の埋入後4，12週時のマイクロCT像

図の上側は皮膚側を示し下側は既存骨側を示す。左列は4週時，右列は12週時の測定結果を示す。X線不透過度に関して，4週及び12週において不透過像が顆粒状に存在していた。全ての試料について埋入時から低下し，エッジに関して，滑らかな（曲率半径の大きい）曲線となっている。

バー：3 mm

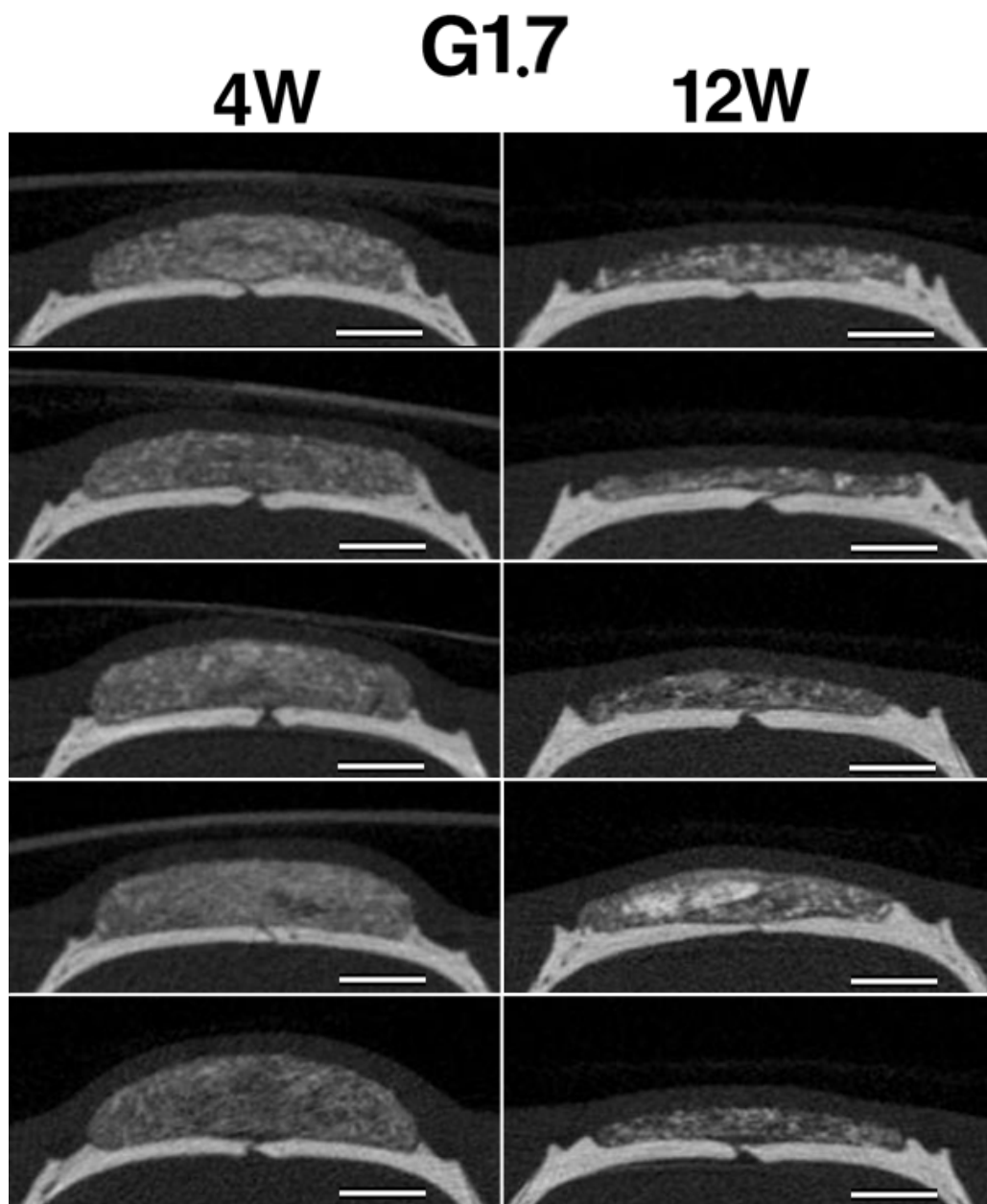


図59：G1.7の埋入後4，12週時のマイクロCT像

図の上側は皮膚側を示し下側は既存骨側を示す。左列は4週時，右列は12週時の測定結果を示す。X線不透過度に関して，4週及び12週において不透過像が顆粒状に存在していた。全ての試料について埋入時から低下し，エッジに関して，滑らかな（曲率半径の大きい）曲線となっている。

バー：3 mm

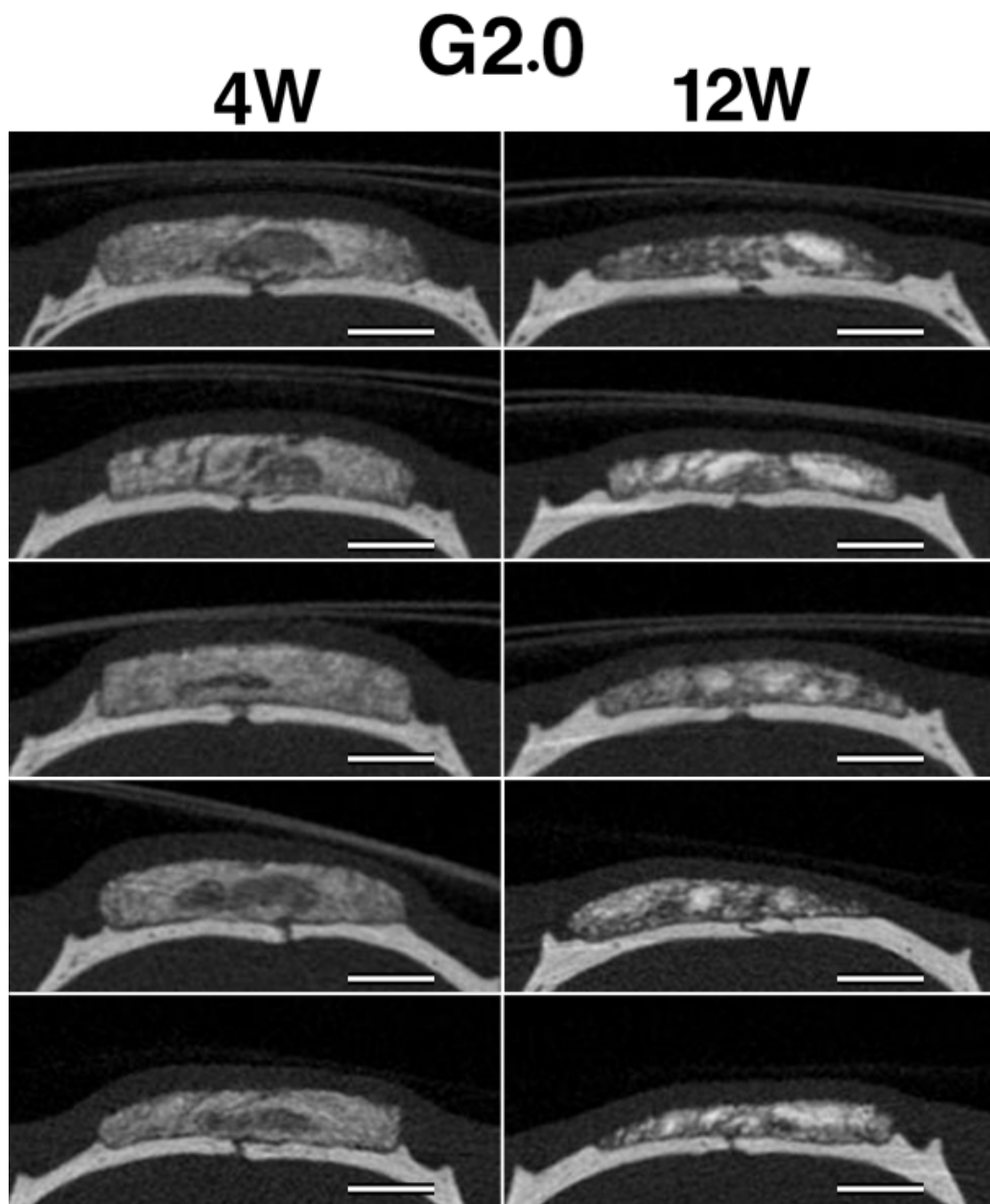


図60：G2.0の埋入後4，12週時のマイクロCT像

図の上側は皮膚側を示し下側は既存骨側を示す。左列は4週時，右列は12週時の測定結果を示す。X線不透過度に関して，4週及び12週において不透過像が顆粒状に存在していた。全ての試料について埋入時から低下し，エッジに関して，滑らかな（曲率半径の大きい）曲線となっている。

バー：3 mm

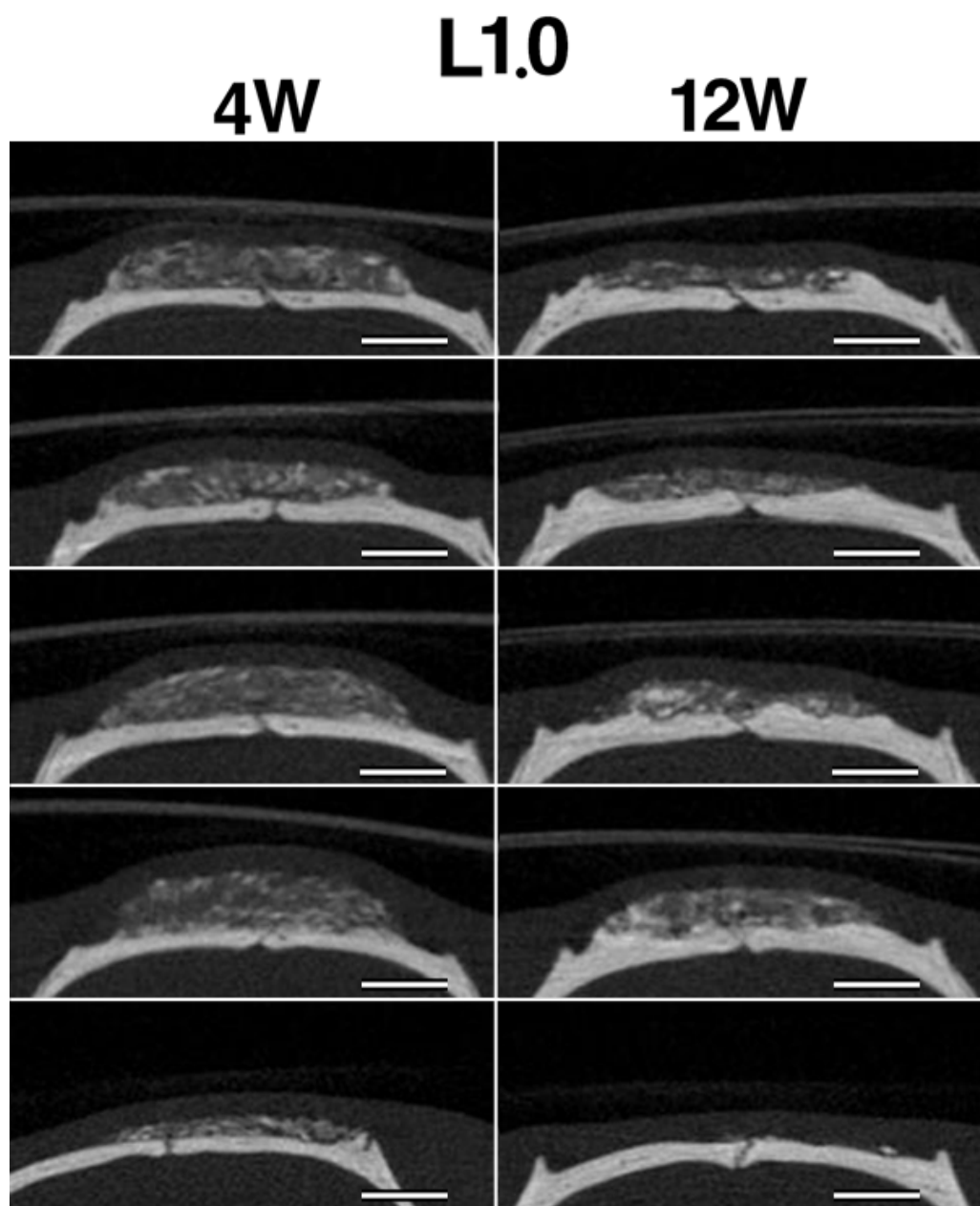


図61：L1.0の埋入後4，12週時のマイクロCT像

図の上側は皮膚側を示し下側は既存骨側を示す。左列は4週時，右列は12週時の測定結果を示す。X線不透過度に関して，4週及び12週において不透過像が顆粒状に存在していた。また，4週時から12週時にかけて不透過度が増しており，辺縁部での不透過像の面積が多かった。既存骨とOCP/Colの境界が明瞭であった。12週では，高さに関して，若干低下した。エッジに関して，4週と比較して，L1.0が（曲率半径の大きい）滑らかな曲線となっていた。

バー：3 mm



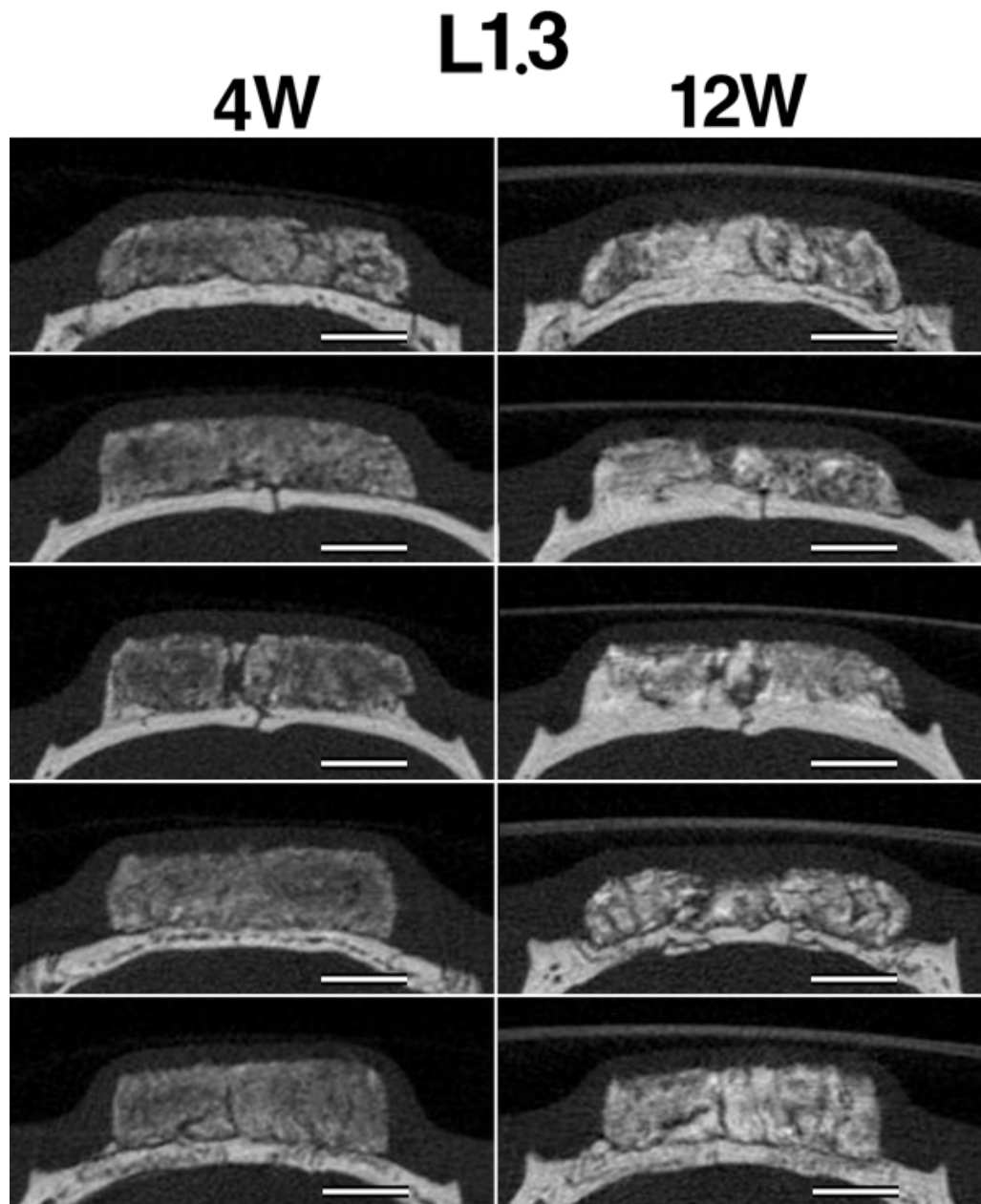


図62：L1.3の埋入後4，12週時のマイクロCT像

図の上側は皮膚側を示し下側は既存骨側を示す。左列は4週時，右列は12週時の測定結果を示す。X線不透過度に関して，4週及び12週において不透過像が顆粒状に存在していた。また，不透過度が増しており，辺縁部での不透過像の面積が多かった。既存骨とOCP/Colの境界が明瞭であった。12週では，高さに関して保持された。エッジに関して，4週と比較して（曲率半径の大きい）滑らかな曲線となっていた。

バー：3 mm

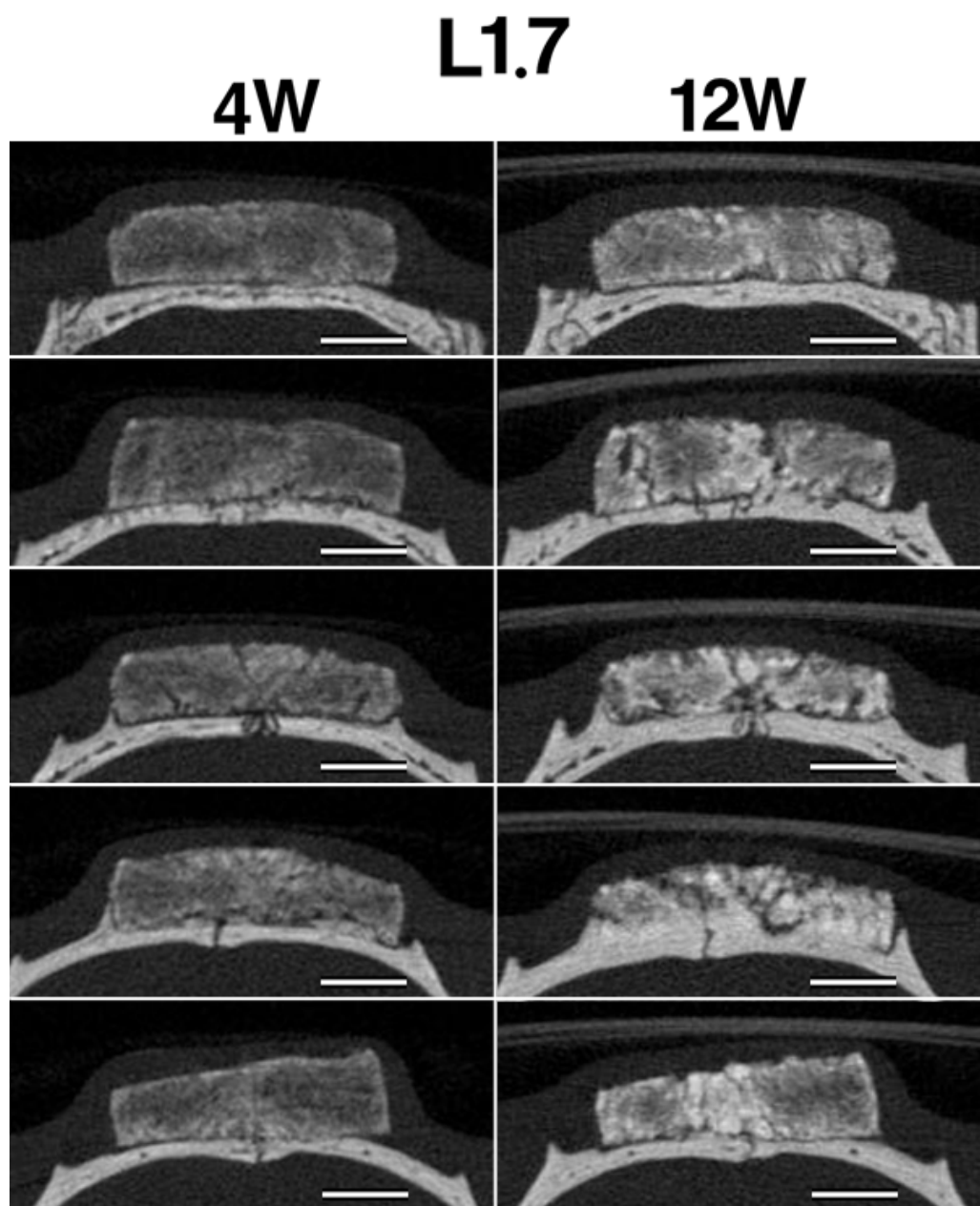


図63：L1.7の埋入後4，12週時のマイクロCT像

図の上側は皮膚側を示し下側は既存骨側を示す。左列は4週時，右列は12週時の測定結果を示す。X線不透過度に関して，4週及び12週において不透過像が顆粒状に存在していた。また，4週時から12週時にかけて不透過度が増しており，辺縁部での不透過像の面積が多かった。既存骨とOCP/Colの境界が明瞭であった。12週では，高さに関しては保持された。エッジに関して，4週と比較しては同等であった。

バー：3 mm

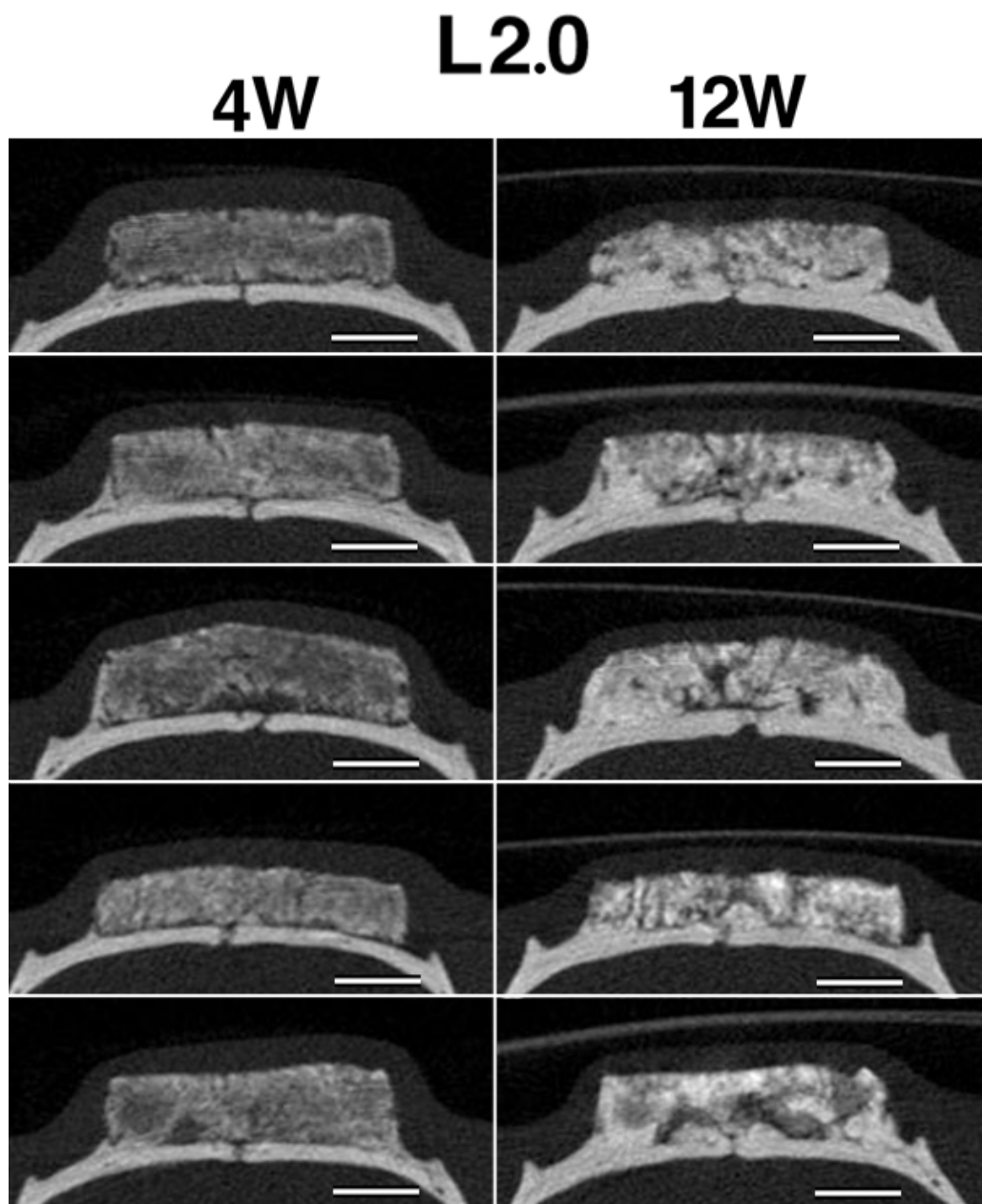


図64：L2.0の埋入後4，12週時のマイクロCT像

図の上側は皮膚側を示し下側は既存骨側を示す。左列は4週時，右列は12週時の測定結果を示す。X線不透過度に関して，4週及び12週において不透過像が顆粒状に存在していた。また，4週時から12週時にかけて不透過度が増しており，辺縁部での不透過像の面積が多かった。既存骨とOCP/Colの境界が明瞭であった。12週では，高さに関しては保持された。エッジに関して，4週と比較して同等であった。

バー：3 mm

## G1.0(12W)

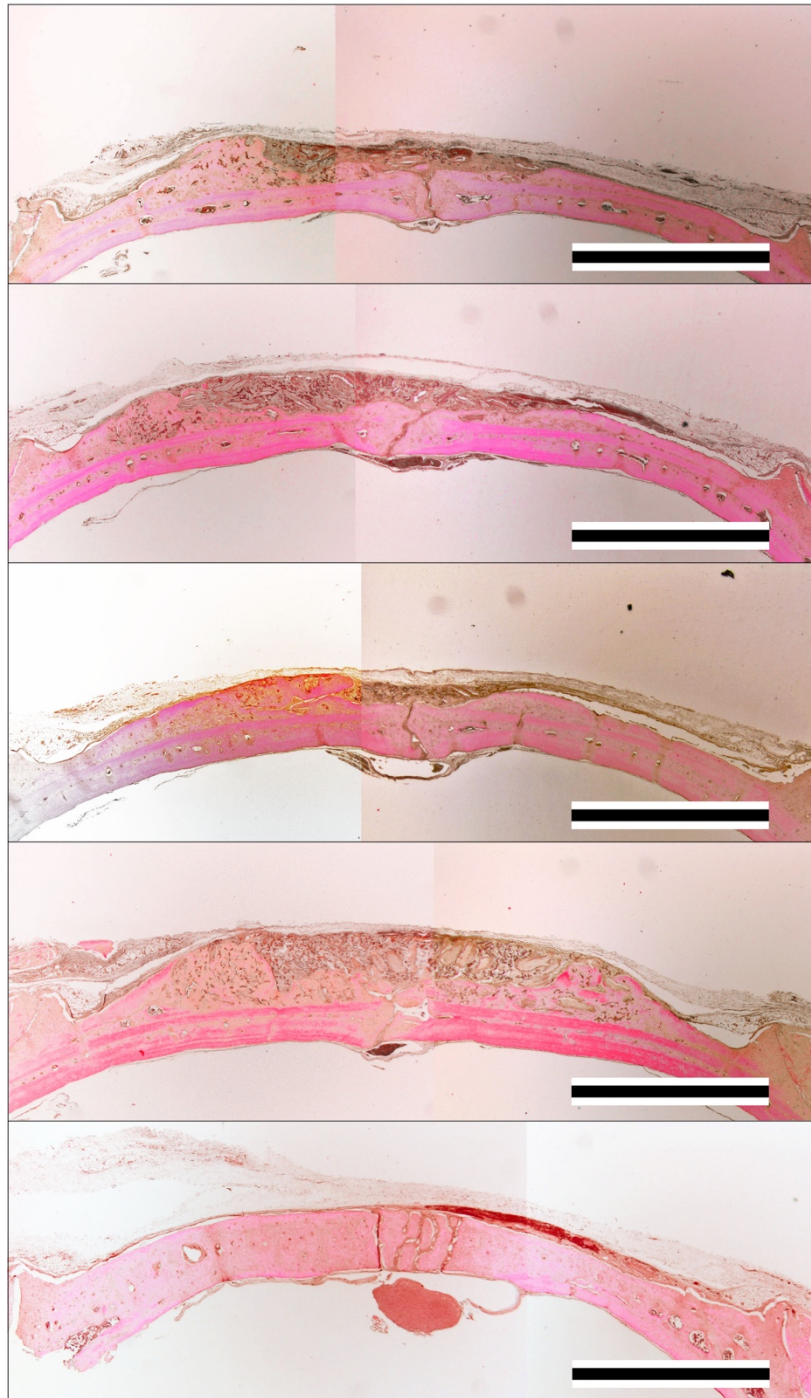


図65 : G1.0の組織学的観察

図の上側は皮膚側を示し下側は既存骨側を示す。左列は4週時，右列は12週時の観察結果を示す。G1.7及びG2.0と比べて高さが低下した。

バー: 3 mm



## G1.3(12W)

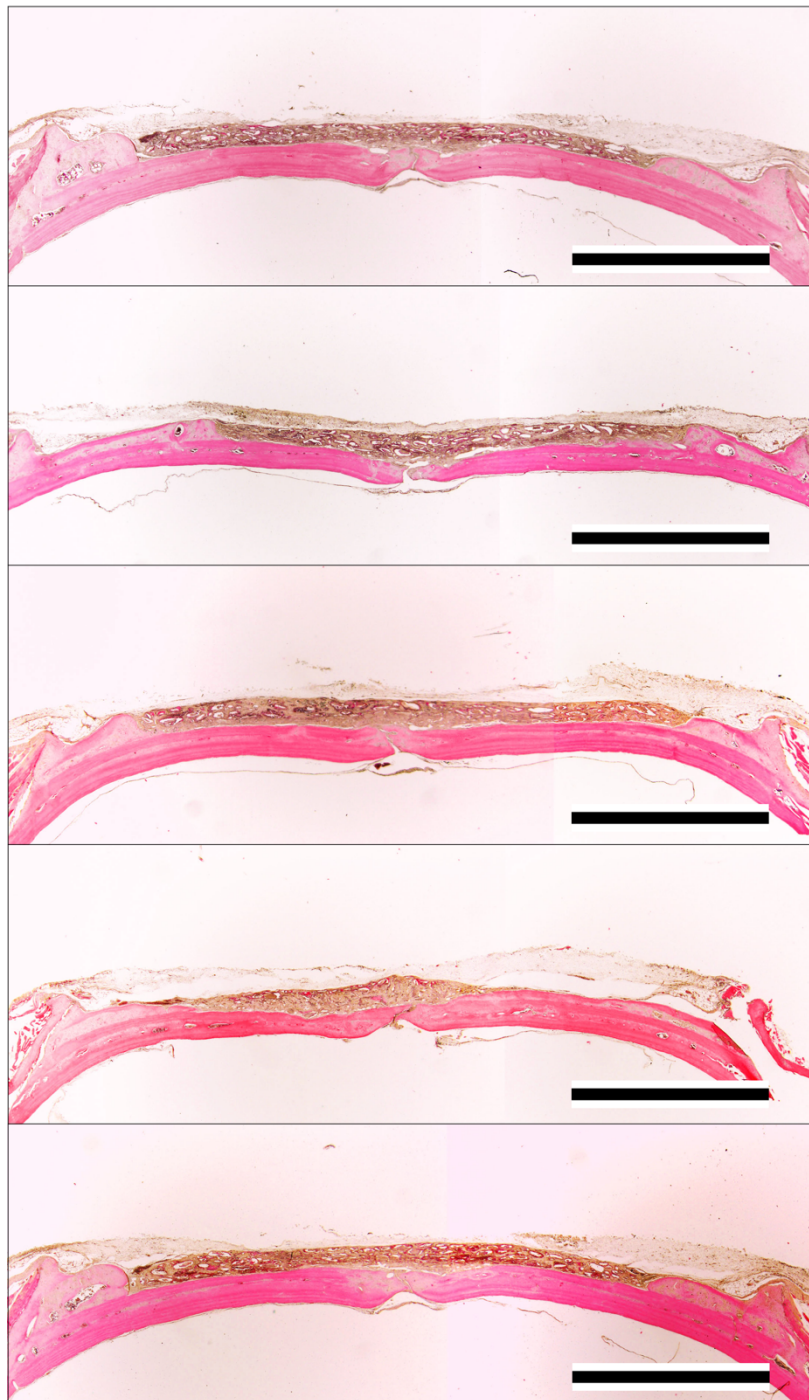


図66 : G1.3の組織学的観察

図の上側は皮膚側を示し下側は既存骨側を示す。全ての試料において、新生骨が辺縁部で見られた。G1.7及びG2.0と比べてOCP/Colの高さが低下した。

バー: 3 mm

## G1.7(12W)

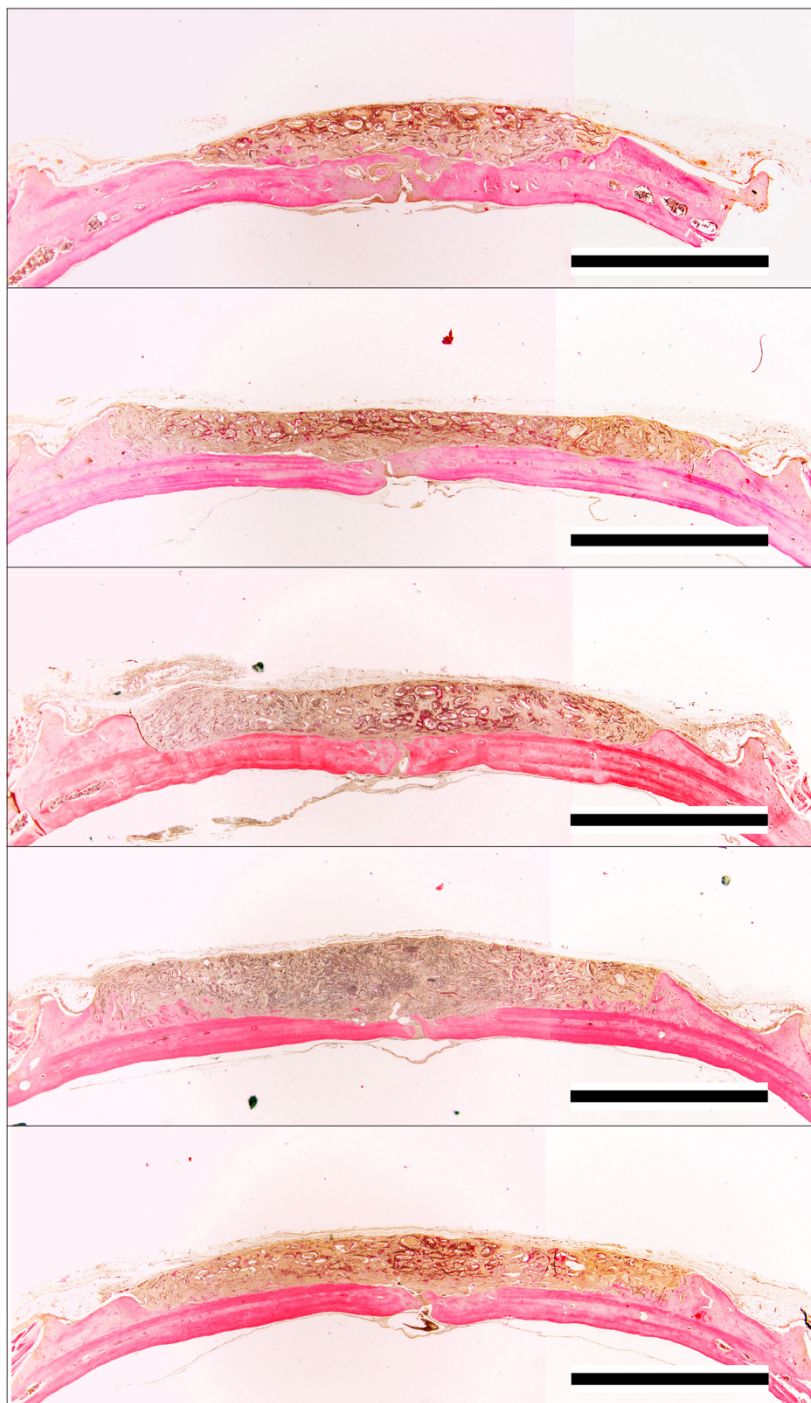


図67：G1.7の組織学的観察

図の上側は皮膚側を示し下側は既存骨側を示す。全ての試料において、新生骨が辺縁部で見られた。高さについて、（G1.0及びG1.3に比べて保てたが）低下した。既存骨が菲薄している試料があった。バー:3 mm

## G2.0(12W)

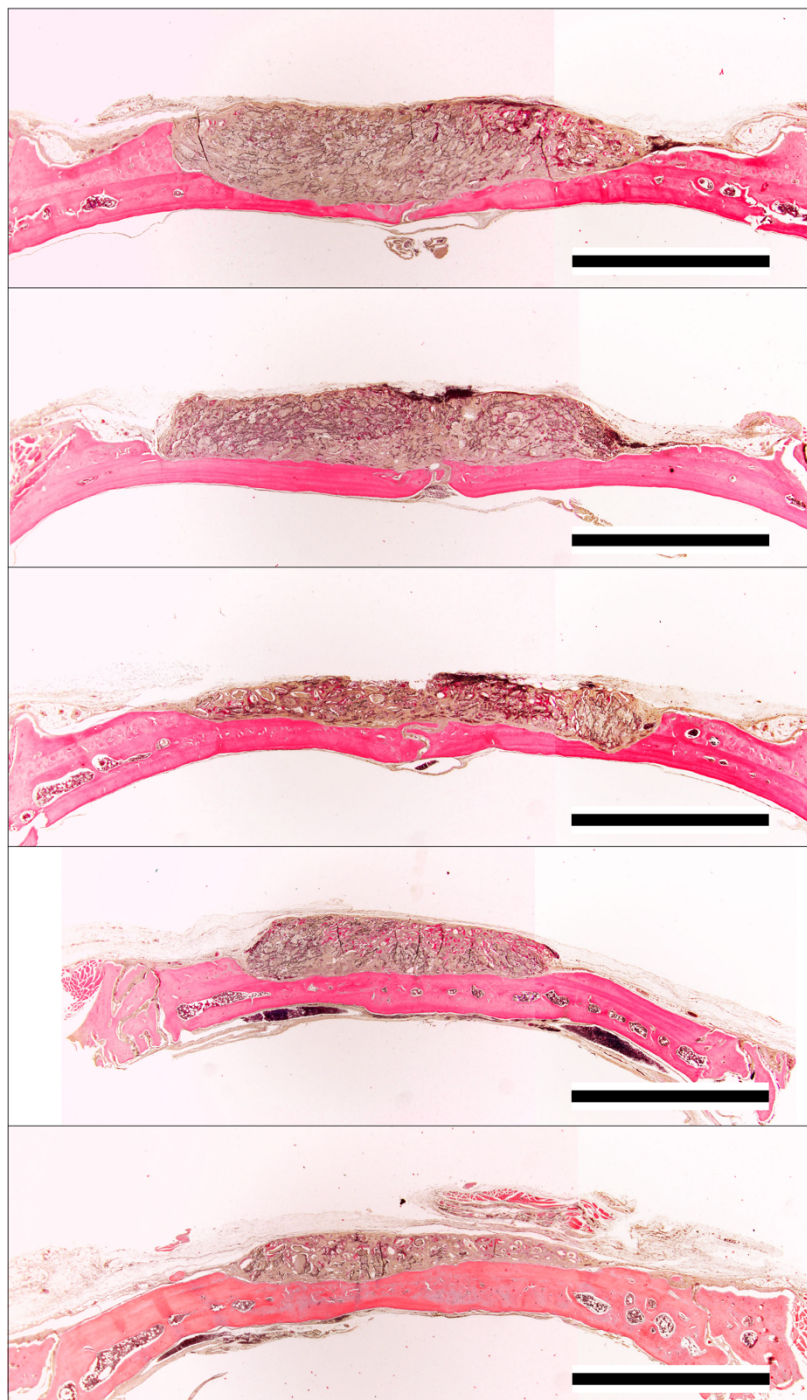


図68：G2.0の組織学的観察

図の上側は皮膚側を示し下側は既存骨側を示す。全ての試料において、新生骨が辺縁部で見られた。高さについて、（G1.0及びG1.3に比べて保てたが）低下した。既存骨が菲薄している試料があった。バー：3 mm



## L1.0(12W)

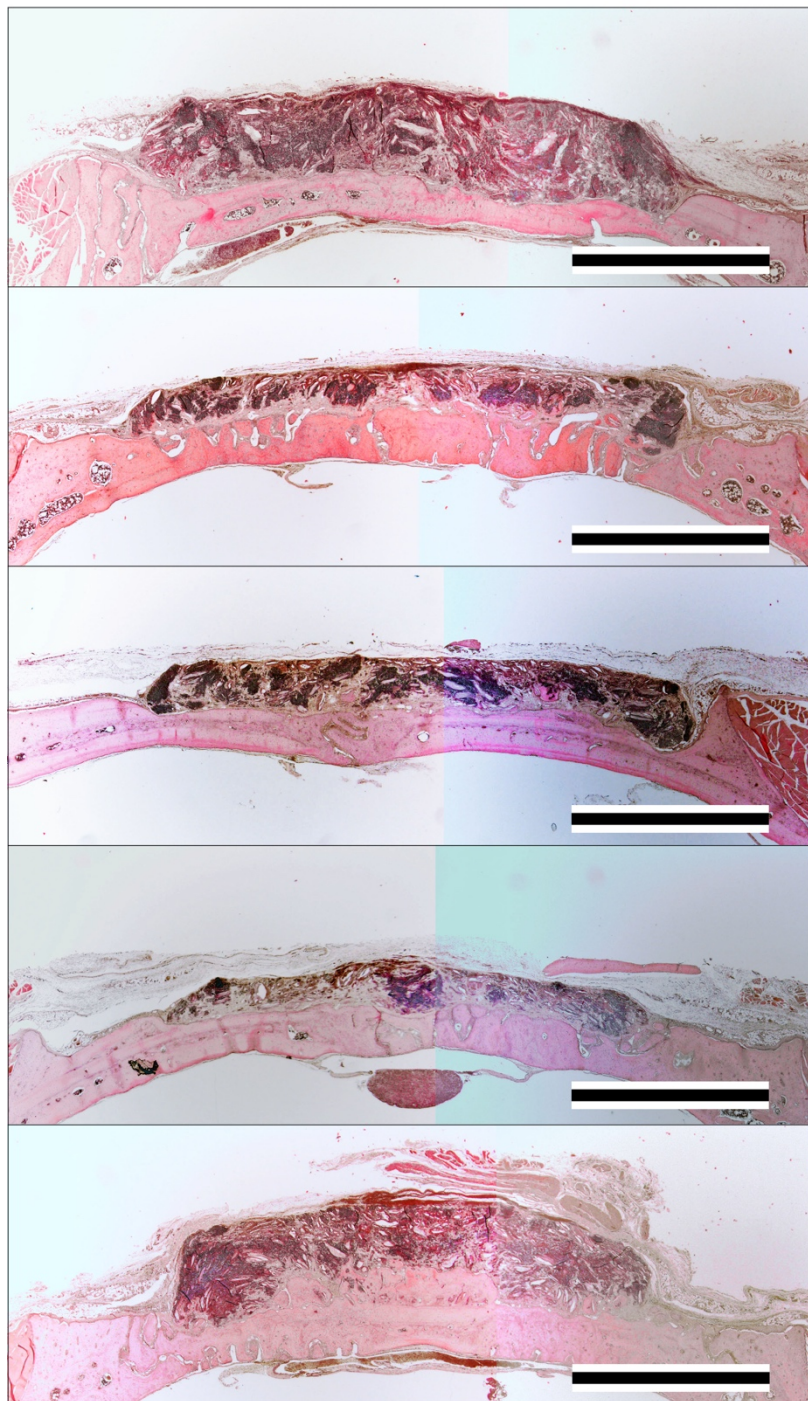


図69：L1.0の組織学的観察

既の上側は皮膚側を示し下側は既存骨側を示す。全ての試料について、既存骨側と辺縁部において、新生骨が形成されていた。バー: 3 mm

## L1.3(12W)

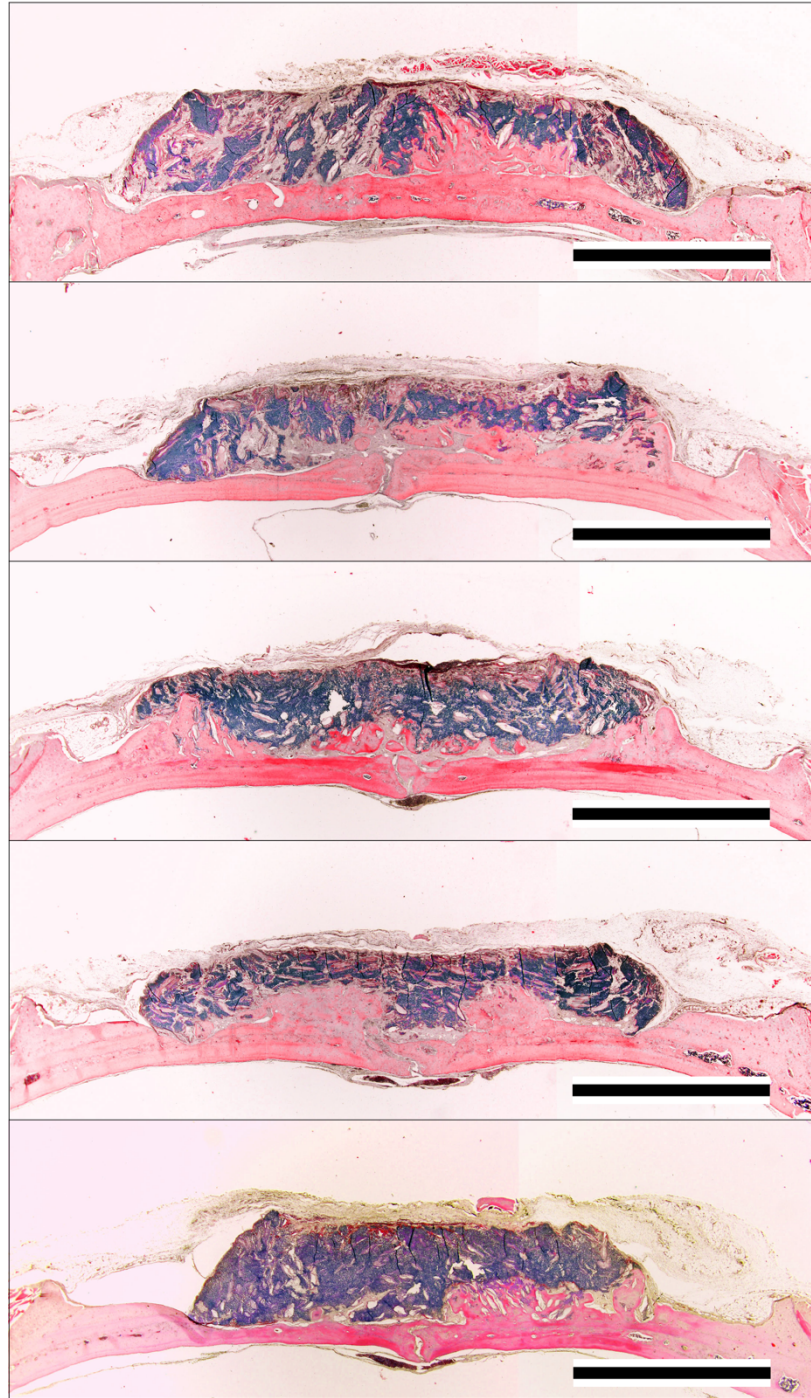


図70 : L1.3の組織学的観察

既の上側は皮膚側を示し下側は既存骨側を示す。全ての試料について、既存骨側と辺縁部において、新生骨が形成されていた。バー:3 mm



## L1.7(12W)

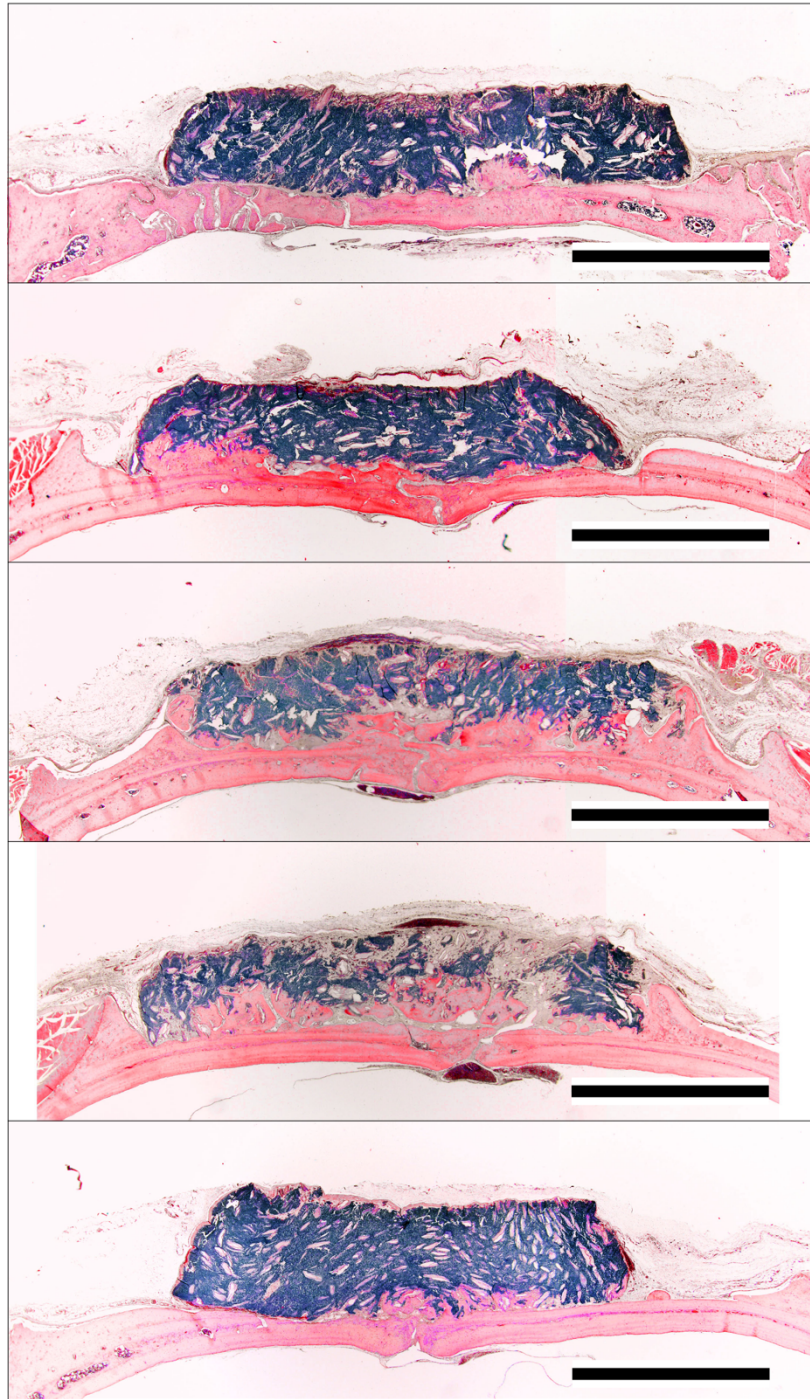


図71：L1.7の組織学的観察

既の上側は皮膚側を示し下側は既存骨側を示す。全ての試料について、既存骨側と辺縁部において、新生骨が形成されていた。バー：3 mm

## L2.0(12W)

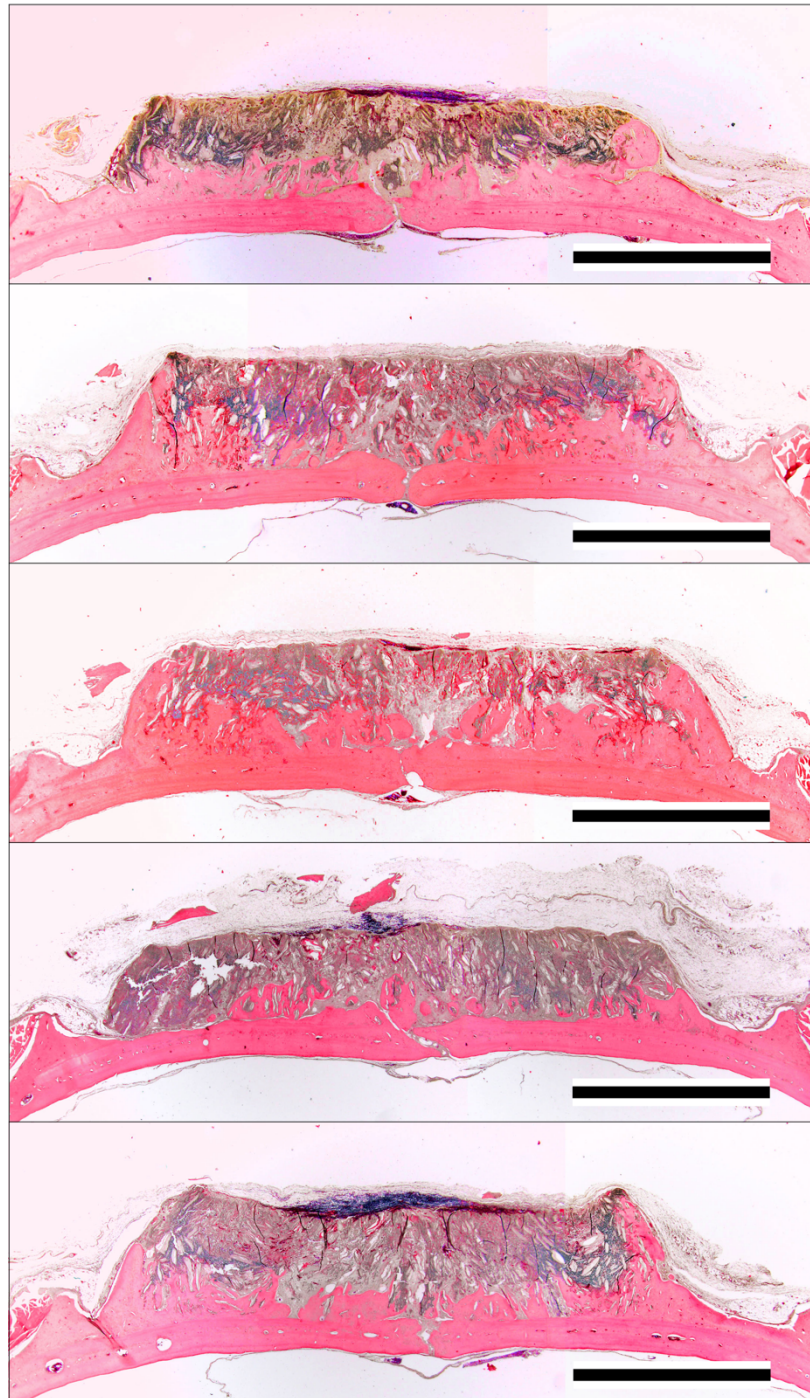


図72：L2.0の組織学的観察

既の上側は皮膚側を示し下側は既存骨側を示す。全ての試料について、既存骨側と辺縁部において、新生骨が形成されていた。バー：3 mm

## 第4章 総括

## 4.1 本研究のまとめ

第1章では、革新的医療技術である再生医療に関連する Tissue Engineering（組織工学）の3要素（細胞、シグナル分子、Scaffold（足場））や、その中の1つである Scaffold として用いられる生体材料（金属材料、リン酸系カルシウムを代表とする無機材料及び生体吸収性高分子材料など）について報告した。次に、リン酸系カルシウムに属する人工骨である OCP/Col に着目し、他の人工骨（HA/Col や  $\beta$ -TCP/Col）に比べて優れた骨再生能を有し、賦形性、操作性にも優れることから、歯科口腔領域の骨欠損を対象として临床上で有用な骨再生用の生体材料として開発され、現在上市されていることを報告した。

歯科口腔外科の分野において、重度歯周病による歯槽骨の吸収等より、歯槽骨に垂直に骨を造成（垂直的骨造成）する需要がある。しかし、既存の人工骨では有効な骨造成は達成されていない。また、開発当初の OCP/Col を単独で用いた場合には、主に骨膜側からの外力により試料の変形と、多核巨細胞による吸収されることから形状保持ができず、新生骨形成も促進されないため、垂直的骨造成は実現できていなかった。このため、第2章と第3章において、異なるアプローチから垂直的骨造成を促進するための検討を行なった。

第2章では、OCP/Col とシグナル分子（TPTD）と生体分解吸収性高分子（PLA）とを併用した。OCP/Col の周囲を樹脂で囲み、外力を緩和することで骨再生能が向上することが報告されていることを参考として、骨形成促進のために TPTD を OCP/Col に滴下したものを PLA ケージで被覆したものを試料としてラット頭蓋冠上の骨膜下に埋入した。併せて、PLA ケージの形状の違い（孔の有無、数）から骨膜の骨形成との関連性の有無について検討を加えた。その結果、TPTD を添加したことにより OCP/Col の新生骨形成を促し、PLA ケージによる被覆により、OCP/Col の形状を維持すると共に線維組織の OCP/Col への侵入を抑制したことにより垂直的骨造成を促進することができた。新生骨形成の主な要因は、既存骨の骨形成細胞と OCP/Col との相互作用であり、その他の要因として、血液等を介して OCP/Col に侵入した骨形成細胞により OCP/Col を核として骨形成が促進したと考えられる。他方、新生骨形成を抑制した要因は、PLA ケージの孔から侵入した線維組織の量が影響したと考えられる。孔が大きい場合は線維組織の影響を受けて新生骨の形成が低下するが、孔の大きさが限定的であると、新生骨の形成が少ないためである。また、PLA ケージの孔に充填された箇所には新生骨の形成が認められなかったことから、骨膜が積極的に骨形成に関与しなかったと考えられる。

第3章では、OCP/Col のみを用いて形状保持し、新生骨形成を促進させることを目的として OCP/Col の製造条件を変更した。第2章において、OCP/Col に PLA を併用すると、PLA を取り出すために侵襲性の高い手術が必要となり、患者や術者の負担が大きいという問題があり、OCP/Col のみを用いて新生骨形成を促進させることが必要であるからである。過去の報告から、ヒト由来の皮膚組織を液体窒素冷却することで炎症が抑えられること、宿主細胞が増加すること、コラーゲンマトリックスが保持されることを参考として、予備凍結において、液体窒素（液相冷却）を用いた（比較対象として気相冷却（ $-80^{\circ}\text{C}$ ）で冷却した試料を用いた。）。また、過去の報告からスキャホールドの密度を増加させた場合に強度が高くなること、OCP の密度が骨形成と関係することを参考として、OCP/Col の密度を開発当初のものに対して増加させた。結果として、気相冷却では、多数の多核巨細胞によ

り試料の吸収が進み形状維持及び新生骨形成ができなかったのに対して、液相冷却では、多核巨細胞の数が少なかったため試料の吸収が抑制され形状が保持されるとともに、骨形成に必要な足場 (OCP/Col) を確保することができた。気相冷却では、OCP/Col 密度を変化させても、新生骨形成が促進されず形状も安定しないのに対し、液相冷却は、OCP/Col 密度を上げていくと、骨形成に必要な足場が確保されたため OCP/Col 濃度を増加させることにより、さらに形状が安定し、新生骨形成量も増加した。以上より、液相冷却と OCP/Col の密度を変更することにより、OCP/Col 単独使用において垂直的骨造成しうる可能性を示唆することができた。

液相冷却による予備凍結を行う処置には体外細胞移植やシグナル分子を用いる必要がなく、将来、垂直的骨造成を達成することを可能とする技術であると考えられる。社会ニーズとして、超高齢化が進み重度歯周病による歯槽骨の萎縮する症例の増大や日常で起きる交通事故などによる顔面陥没骨折に対して、垂直的骨造成による骨の再生が必要となる。また、現在、細胞シートや幹細胞移植による歯周組織再生については優れた効果が認められているが、細胞培養施設の建設や培養費用、人件費などコストを含めると決して安価ではなく、人工骨に関しても費用対効果のある製品が社会に求められる。OCP/Col は試料の密度を変更し、窒素冷却をすると垂直的骨造成を達成する可能性を示したが、今後は、長期間の検討や、垂直的骨造成を促進するための検討をすることも必要であると考えられる。例えば、他の人工骨では構造を連通孔として骨再生能が向上させている製品があり、第 2 章において OCP/Col に TPTD 添加することにより骨再生能が向上することが示されている。これらも参考に、今後、OCP/Col に孔を形成することや、TPTD を添加することによりさらに垂直的骨造成が促進する可能性を探索することも必要となる。



## 引用文献

1. 玄丞然. スキャホールド 生分解吸収性高分子. 岡野光夫, 大和雅之 編. 再生医療技術の最前線: 株式会社シーエムシー出版; 2013. p. 1-7.
2. 田畑泰彦. バイオマテリアル足場技術の現状と今後 - 再生治療と再生研究 -. 辻賢司 編. 再生医療用足場材料の開発と市場: 株式会社シーエムシー出版; 2016. p. 3-13.
3. 澤芳樹. 再生医療の最前線. 医療と社会. 2018; 28 No.1: 93-102.
4. Vacanti JP, Morse MA, Saltzman WM, Domb AJ, Perez-Atayde A, Langer R. Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. *J Pediatr Surg*. 1988; 23(1 Pt 2): 3-9.
5. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993; 260(5110): 920-6.
6. 中内啓光. 幹細胞研究と再生医療. 中内啓光 編. 幹細胞研究と再生医療: 南山堂; 2013. p. 3.
7. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 1978; 4(1-2): 7-25.
8. 石川烈, 岩田隆紀. 歯周病の再生医療. 上田実, 朝比奈泉 編. 再生医療叢書 歯学系: 朝倉書店; 2012. p. 40-86.
9. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*. 2006; 126(4): 677-89.
10. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones, JP. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998; 282(5391): 1145-7.
11. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007; 131(5): 861-72.
12. 立石哲也. 再生軟骨のための材料技術. 立石哲也 編. ここまできた人工骨・関節 - バイオマテリアルから再生医工学へ: 米田出版; 2012. p. 75-94.
13. 松本歯科大学大学院硬組織研究グループ. ホルモン・サイトカインとそれらの受容体. 香西敏男 編. *Hard Tissue 硬組織研究ハンドブック*: MDU(松本歯科大学) 出版会; 2005. p. 84-147.
14. 紙谷聡英, 近田裕美. 肝臓の再生医療に向けた幹細胞研究の進展. In: 中内啓光 編. 幹細胞研究と再生医療: 南山堂; 2013. p. 183-91.
15. 山岡哲二. バイオリジカルスキャホールド. *人工臓器*. 2011; 40 巻: 231-5.
16. Akao M, Aoki H, Kato K. Flexural strength of mixed hydroxyapatite-tricalcium phosphate ceramics. *Tokyo Ika Shika Daigaku Iyo Kizai Kenkyusho Hokoku*. 1981; 15: 17-22.
17. 玄丞然. 生体内分解吸収性高分子材料. *BME*. 1990; 4: 41-50.
18. 玄丞然. 再生歯科医学のための生体材料開発の現状と展望. *ザ・クインテッセンス*. 2003; 22: 485-90.
19. 勝部好裕, 弓場俊輔, 大串始. 間葉系幹細胞を使った骨再生. 脇谷滋之, 鄭雄一 編. 再生医療叢書 骨格系: 朝倉書店; 2012. p. 92-107.
20. Block JE, Thorn MR. Clinical indications of calcium-phosphate biomaterials and related composites for orthopedic procedures. *Calcif Tissue Int*. 2000; 66(3): 234-8.
21. 名井 陽. 人工骨の歴史と最新デザインコンセプト. *人工臓器*. 2011; 40 巻: 76-80.

22. Nagai H, Kobayashi-Fujioka M, Fujisawa K, Ohe G, Takamaru N, Hara K, Uchida D, Tamatani T, Ishikawa K, Miyamoto Y. Effects of low crystalline carbonate apatite on proliferation and osteoblastic differentiation of human bone marrow cells. *J Mater Sci Mater Med*. 2015; 26(2): 99.
23. Kikuchi M, Itoh S, Ichinose S, Shinomiya K, Tanaka J. Self-organization mechanism in a bone-like hydroxyapatite/collagen nanocomposite synthesized in vitro and its biological reaction in vivo. *Biomaterials*. 2001; 22(13): 1705-11.
24. 久森紀之, 大塚雄市. 初学者のためのバイオマテリアル 3. セラミック系バイオマテリアル. *Jornal of the Society of Materials Science*. 2014; 63 巻 : 563-8.
25. Nakamura T, Yamamuro T, Higashi S, Kokubo T, Itoo S. A new glass-ceramic for bone replacement: evaluation of its bonding to bone tissue. *J Biomed Mater Res*. 1985; 19(6): 685-98.
26. Tamai N, Myoui A, Tomita T, Nakase T, Tanaka J, Ochi T, Yoshikawa H. Novel hydroxyapatite ceramics with an interconnective porous structure exhibit superior osteoconduction in vivo. *J Biomed Mater Res*. 2002; 59(1): 110-7.
27. Myoui A. Three-dimensionally engineered hydroxyapatite ceramics with interconnected pores as a bone substitute and tissue engineering scaffold. *Biomaterials in Orthopedics*, ed by Yaszemski MJ, Trantolo DJ, Lewandrowski K, et al, Marcel Dekker, New York, 2003; 287-300.
28. Sakamoto M, Nakasu M, Matsumoto T, Okihana H. Development of superporous hydroxyapatites and their examination with a culture of primary rat osteoblasts. *J Biomed Mater Res A*. 2007; 82(1): 238-42.
29. Ogose A, Kondo N, Umezu H, Hotta T, Kawashima H, Tokunaga K, Ito T, Kubo N, Hoshino M, Gu W, Endo N. Histological assessment in grafts of highly purified beta-tricalcium phosphate (OSferion) in human bones. *Biomaterials*. 2006; 27(8): 1542-9.
30. Chazono M, Tanaka T, Komaki H, Fujii K. Bone formation and bioresorption after implantation of injectable beta-tricalcium phosphate granules-hyaluronate complex in rabbit bone defects. *J Biomed Mater Res A*. 2004; 70(4): 542-9.
31. 鎌倉慎治. 人工骨. 人工臓器. 2018; 47 巻(3号): 180-4.
32. Doi Y ST, Moriwaki Y, Kajimoto T, Iwayama Y. Sintered carbonate apatites as bioresorbable bone substitutes. *J Biomed Mater Res*. 1998; 39: 603-10.
33. Tsuchiya A, Sotome S, Asou Y, Kikuchi M, Koyama Y, Ogawa T, Tanaka J, Shinomiya K. Effects of pore size and implant volume of porous hydroxyapatite/collagen (HAp/Col) on bone formation in a rabbit bone defect model. *J Med Dent Sci*. 2008; 55(1): 91-9.
34. Sotome S, Ae K, Okawa A, Ishizuki M, Morioka H, Matsumoto S, Nakamura T, Abe S, Beppu Y, Shinomiya K. Efficacy and safety of porous hydroxyapatite/type 1 collagen composite implantation for bone regeneration: A randomized controlled study. *J Orthop Sci*. 2016; 21(3): 373-80.
35. Garcia-Gareta E, Coathup MJ, Blunn GW. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. *Bone*. 2015; 81: 112-21.
36. Brown WE SJ, Frazier AW, Lehr JR. Crystallographic and chemical relations between octacalcium phosphate and hydroxyapatite. *Nature*. 1962; 196(4859): 1050-5.
37. Iijima M, Tohda H, Suzuki H, Yanagisawa T, Moriwaki Y. Effects of F<sup>-</sup> on apatite-octacalcium phosphate intergrowth and crystal morphology in a model system of tooth enamel formation. *Calcif Tissue Int*. 1992; 50(4): 357-61.

38. Anada T, Kumagai T, Honda Y, Masuda T, Kamijo R, Kamakura S, Yoshihara N, Kuriyagawa T, Shimauchi H, Suzuki O. Dose-dependent osteogenic effect of octacalcium phosphate on mouse bone marrow stromal cells. *Tissue Eng Part A*. 2008; 14(6): 965-78.
39. Suzuki O, Nakamura M, Miyasaka Y, Kagayama M, Sakurai M. Bone formation on synthetic precursors of hydroxyapatite. *Tohoku J Exp Med*. 1991; 164(1): 37-50.
40. Kamakura S, Sasano Y, Nakamura M, Suzuki O, Ohki H, Kagayama M, Motegi, K. Initiation of alveolar ridge augmentation in the rat mandible by subperiosteal implantation of octacalcium phosphate. *Arch Oral Biol*. 1996; 41(11): 1029-38.
41. Sasano Y, Kamakura S, Homma H, Suzuki O, Mizoguchi I, Kagayama M. Implanted octacalcium phosphate (OCP) stimulates osteogenesis by osteoblastic cells and/or committed osteoprogenitors in rat calvarial periosteum. *Anat Rec*. 1999; 256(1): 1-6.
42. Barrere F, van der Valk CM, Dalmeijer RA, van Blitterswijk CA, de Groot K, Layrolle P. In vitro and in vivo degradation of biomimetic octacalcium phosphate and carbonate apatite coatings on titanium implants. *J Biomed Mater Res A*. 2003; 64(2): 378-87.
43. Habibovic P, Li J, van der Valk CM, Meijer G, Layrolle P, van Blitterswijk CA, de Groot K. Biological performance of uncoated and octacalcium phosphate-coated Ti6Al4V. *Biomaterials*. 2005; 26(1): 23-36.
44. Shelton RM, Liu Y, Cooper PR, Gbureck U, German MJ, Barralet JE. Bone marrow cell gene expression and tissue construct assembly using octacalcium phosphate microscavolds. *Biomaterials*. 2006; 27(14): 2874-81.
45. Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg*. 1990; 1(1): 60-8.
46. Kamakura S, Sasano Y, Homma H, Suzuki O, Kagayama M, Motegi K. Implantation of octacalcium phosphate nucleates isolated bone formation in rat skull defects. *Oral Dis*. 2001; 7(4): 259-65.
47. Suzuki O, Kamakura S, Katagiri T, Nakamura M, Zhao B, Honda Y, Kamijo R. Bone formation enhanced by implanted octacalcium phosphate involving conversion into Ca-deficient hydroxyapatite. *Biomaterials*. 2006; 27(13): 2671-81.
48. Kamakura S, Sasano Y, Homma H, Suzuki O, Kagayama M, Motegi K. Implantation of octacalcium phosphate (OCP) in rat skull defects enhances bone repair. *J Dent Res*. 1999; 78(11): 1682-7.
49. Kamakura S, Sasano Y, Homma-Ohki H, Nakamura M, Suzuki O, Kagayama M, Motegi, K. Multinucleated giant cells recruited by implantation of octacalcium phosphate (OCP) in rat bone marrow share ultrastructural characteristics with osteoclasts. *J Electron Microsc (Tokyo)*. 1997; 46(5): 397-403.
50. Kamakura S, Sasano Y, Shimizu T, Hatori K, Suzuki O, Kagayama M, Mogege K. Implanted octacalcium phosphate is more resorbable than beta-tricalcium phosphate and hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res*. 2002; 59(1): 29-34.
51. Kamakura S, Nakajo S, Suzuki O, Sasano Y. New scaffold for recombinant human bone morphogenetic protein-2. *J Biomed Mater Res A*. 2004; 71(2): 299-307.
52. Kamakura S, Sasaki K, Honda Y, Anada T, Suzuki O. Octacalcium phosphate combined with collagen orthotopically enhances bone regeneration. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2006; 79(2): 210-7.
53. 鎌倉慎治. 「東北大」発の骨再生材料の開発を目指して. *東北医誌*. 2009; 121(2): 157-9.

54. Matsui A, Anada T, Masuda T, Honda Y, Miyatake N, Kawai T, Suzuki O, Kamakura S, Echigo S. Mechanical stress-related calvaria bone augmentation by onlayed octacalcium phosphate-collagen implant. *Tissue Eng Part A*. 2010; 16(1): 139-51.
55. Suzuki Y, Kamakura S, Honda Y, Anada T, Hatori K, Sasaki K, Suzuki O. Appositional bone formation by OCP-collagen composite. *J Dent Res*. 2009; 88(12): 1107-12.
56. Kamakura S, Sasaki K, Honda Y, Anada T, Matsui K, Echigo S, Suzuki O. Dehydrothermal treatment of collagen influences on bone regeneration by octacalcium phosphate (OCP) collagen composites. *J Tissue Eng Regen Med*. 2007; 1(6): 450-6.
57. Tanuma Y, Anada T, Honda Y, Kawai T, Kamakura S, Echigo S, Suzuki O. Granule size-dependent bone regenerative capacity of octacalcium phosphate in collagen matrix. *Tissue Eng Part A*. 2012; 18(5-6): 546-57.
58. Kawai T, Anada T, Honda Y, Kamakura S, Matsui K, Matsui A, Sasaki K, Morimoto S, Echigo S, Suzuki S. Synthetic octacalcium phosphate augments bone regeneration correlated with its content in collagen scaffold. *Tissue Eng Part A*. 2009; 15(1): 23-32.
59. Kamakura S, Sasaki K, Homma T, Honda Y, Anada T, Echigo S, Suzuki O. The primacy of octacalcium phosphate collagen composites in bone regeneration. *J Biomed Mater Res A*. 2007; 83(3): 725-33.
60. Kouketsu A, Matsui K, Kawai T, Ezoe Y, Yanagisawa T, Yasuda A, Takahashi T, Kamakura S. Octacalcium phosphate collagen composite stimulates the expression and activity of osteogenic factors to promote bone regeneration. *J Tissue Eng Regen Med*. 2019; 14(1): 99-107.
61. Kawai T, Anada T, Masuda T, Honda Y, Sakai Y, Kato Y, Kamakura S, Echigo S, Suzuki O. The effect of synthetic octacalcium phosphate in a collagen scaffold on the osteogenicity of mesenchymal stem cells. *Eur Cell Mater*. 2011; 22: 124-36.
62. Kawai T, Matsui K, Iibuchi S, Anada T, Honda Y, Sasaki K, Kamakura S, Suzuki O, Echigo S. Reconstruction of critical-sized bone defect in dog skull by octacalcium phosphate combined with collagen. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2011; 13(2): 112-23.
63. Tanuma Y, Matsui K, Kawai T, Matsui A, Suzuki O, Kamakura S, Echigo S. Comparison of bone regeneration between octacalcium phosphate/collagen composite and beta-tricalcium phosphate in canine calvarial defect. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2013; 115(1): 9-17.
64. Iibuchi S, Matsui K, Kawai T, Sasaki K, Suzuki O, Kamakura S, Echigo S. Octacalcium phosphate (OCP) collagen composites enhance bone healing in a dog tooth extraction socket model. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2010; 39(2): 161-8.
65. Matsui A, Matsui K, Handa T, Tanuma Y, Miura K, Kato Y, Kawai T, Suzuki O, Kamakura S, Echigo S. The regenerated bone quality by implantation of octacalcium phosphate collagen composites in a canine alveolar cleft model. *Cleft Palate Craniofac J*. 2014; 51(4): 420-30.
66. Matsui K, Matsui A, Handa T, Kawai T, Suzuki O, Kamakura S, Echigo S. Bone regeneration by octacalcium phosphate collagen composites in a dog alveolar cleft model. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2010; 39(12): 1218-25.
67. Kawai T, Echigo S, Matsui K, Tanuma Y, Takahashi T, Suzuki O, Kamakura S. First clinical application of octacalcium phosphate collagen composite in human bone defect. *Tissue Eng Part A*. 2014; 20(7-8): 1336-41.

68. Kawai T, Suzuki O, Matsui K, Tanuma Y, Takahashi T, Kamakura S. Octacalcium phosphate collagen composite facilitates bone regeneration of large mandibular bone defect in humans. *J Tissue Eng Regen Med*. 2017; 11(5): 1641-7.
69. Tallgren A. The continuing reduction of the residual alveolar ridges in complete denture wearers: a mixed-longitudinal study covering 25 years. 1972. *J Prosthet Dent*. 2003; 89(5): 427-35.
70. Buser D, Martin W, Belser UC. Optimizing esthetics for implant restorations in the anterior maxilla: anatomic and surgical considerations. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2004; 19 Suppl: 43-61.
71. 片桐 抄. 歯・歯周組織の再生. 中内啓光 編. 幹細胞研究と再生医療: 南山堂; 2013. p. 223-30.
72. Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1982; 9(4): 290-6.
73. Dahlin C, Sennerby L, Lekholm U, Linde A, Nyman S. Generation of new bone around titanium implants using a membrane technique: an experimental study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1989; 4(1): 19-25.
74. Ilizarov GA. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues. Part I. The influence of stability of fixation and soft-tissue preservation. *Clin Orthop Relat Res*. 1989(238): 249-81.
75. Howell TH, Fiorellini J, Jones A, Alder M, Nummikoski P, Lazaro M, Lilly L, Cochran D. A feasibility study evaluating rhBMP-2/absorbable collagen sponge device for local alveolar ridge preservation or augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1997; 17(2): 124-39.
76. Carragee EJ, Hurwitz EL, Weiner BK. A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned. *Spine J*. 2011; 11(6): 471-91.
77. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998; 85(6): 638-46.
78. Clavero J, Lundgren S. Ramus or chin grafts for maxillary sinus inlay and local onlay augmentation: comparison of donor site morbidity and complications. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2003; 5(3): 154-60.
79. Jensen SS, Terheyden H. Bone augmentation procedures in localized defects in the alveolar ridge: clinical results with different bone grafts and bone-substitute materials. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009; 24 Suppl: 218-36.
80. Fujita R, Yokoyama A, Kawasaki T, Kohgo T. Bone augmentation osteogenesis using hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate blocks. *J Oral Maxillofac Surg*. 2003; 61(9): 1045-53.
81. Ozawa Y, Kubota T, Yamamoto T, Tsukune N, Koshi R, Nishida T, Asano M, Sato S. Comparison of the bone augmentation ability of absorbable collagen sponge with that of hydroxyapatite/collagen composite. *J Oral Sci*. 2018; 60(4): 514-8.
82. Akino N, Tachikawa N, Miyahara T, Ikumi R, Kasugai S. Vertical ridge augmentation using a porous composite of uncalcined hydroxyapatite and poly-DL-lactide enriched with types 1 and 3 collagen. *Int J Implant Dent*. 2019; 5(1): 16.

83. Park JC, So SS, Jung IH, Yun JH, Choi SH, Cho KS, Kim CS. Induction of bone formation by *Escherichia coli*-expressed recombinant human bone morphogenetic protein-2 using block-type macroporous biphasic calcium phosphate in orthotopic and ectopic rat models. *J Periodontal Res.* 2011; 46(6): 682-90.
84. Oginuma T, Sato S, Udagawa A, Saito Y, Arai Y, Ito K. Autogenous bone with or without hydroxyapatite bone substitute augmentation in rat calvarium within a plastic cap. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012; 114(5 Suppl): S107-13.
85. Zigdon-Giladi H, Bick T, Morgan EF, Lewinson D, Machtei EE. Peripheral blood-derived endothelial progenitor cells enhance vertical bone formation. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2015; 17(1): 83-92.
86. Nakahara H, Bruder SP, Haynesworth SE, Holecek JJ, Baber MA, Goldberg VM, Caplan AI. Bone and cartilage formation in diffusion chambers by subcultured cells derived from the periosteum. *Bone.* 1990; 11(3): 181-8.
87. Kajii F, Iwai A, Tanaka H, Matsui K, Kawai T, Kamakura S. Single-dose local administration of teriparatide with an octacalcium phosphate collagen composite enhances bone regeneration in a rodent critical-sized calvarial defect. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2018; 106(5): 1851-7.
88. Kaneko H, Kamiie J, Kawakami H, Anada T, Honda Y, Shiraishi N, Kamakura S, Terasaki T, Simauchi H, Suzuki O. Proteome analysis of rat serum proteins adsorbed onto synthetic octacalcium phosphate crystals. *Anal Biochem.* 2011; 418(2): 276-85.
89. Iwai A, Kajii F, Tanaka H, Sasaki K, Matsui K, Kawai T, Kamakura S. Bone regeneration by freeze-dried composite of octacalcium phosphate collagen and teriparatide. *Oral Dis.* 2018; 24(8): 1514-21.
90. Miettinen H, Makela EA, Vainio J, Rokkanen P, Tormala P. The effect of an intramedullary self-reinforced poly-L-lactide (SR-PLLA) implant on growing bone with special reference to fixation properties. An experimental study on growing rabbits. *J Biomater Sci Polym Ed.* 1992; 3(6): 443-50.
91. Wang JS, Aspenberg P. Basic fibroblast growth factor promotes bone ingrowth in porous hydroxyapatite. *Clin Orthop Relat Res.* 1996(333): 252-60.
92. Niall HD, Sauer RT, Jacobs JW, Keutmann HT, Segre GV, O'Riordan JL, Aurbach GD, Potts JT. The amino-acid sequence of the amino-terminal 37 residues of human parathyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1974; 71(2): 384-8.
93. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Roberson P, Parfitt AM, Manolagas SC. Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. *J Clin Invest.* 1999; 104(4): 439-46.
94. Tam CS, Heersche JN, Murray TM, Parsons JA. Parathyroid hormone stimulates the bone apposition rate independently of its resorptive action: differential effects of intermittent and continuous administration. *Endocrinology.* 1982; 110(2): 506-12.
95. Jacobson JA, Yanoso-Scholl L, Reynolds DG, Dadali T, Bradica G, Bukata S, Puzas EJ, Zuscik MJ, Rosier R, O'Keefe RJ, Schwarz EM, Awad HA. Teriparatide therapy and beta-tricalcium phosphate enhance scaffold reconstruction of mouse femoral defects. *Tissue Eng Part A.* 2011; 17(3-4): 389-98.
96. Pensak M, Hong SH, Dukas A, Bayron J, Tinsley B, Jain A, Tang A, Rowe D, Lieberman JR. Combination therapy with PTH and DBM cannot heal a critical sized murine femoral defect. *J Orthop Res.* 2015; 33(8): 1242-9.

97. Rowshan HH, Parham MA, Baur DA, McEntee RD, Cauley E, Carriere DT, Wood JC, Demsar WJ, Pizarro JP. Effect of intermittent systemic administration of recombinant parathyroid hormone (1-34) on mandibular fracture healing in rats. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010; 68(2): 260-7.
98. Stancoven BW, Lee J, Dixon DR, McPherson JC, 3rd, Bisch FC, Wikesjo UM, Susin C. Effect of bone morphogenetic protein-2, demineralized bone matrix and systemic parathyroid hormone (1-34) on local bone formation in a rat calvaria critical-size defect model. *J Periodontal Res.* 2013; 48(2): 243-51.
99. Yun JI, Wikesjo UM, Borke JL, Bisch FC, Lewis JE, Herold RW, Swiec GD, Wood JC, McPherson JC., 3rd. Effect of systemic parathyroid hormone (1-34) and a beta-tricalcium phosphate biomaterial on local bone formation in a critical-size rat calvarial defect model. *J Clin Periodontol.* 2010; 37(5): 419-26.
- 100 . Chan HL, McCauley LK. Parathyroid hormone applications in the craniofacial skeleton. *J Dent Res.* 2013; 92(1): 18-25.
- 101 . Morimoto T, Kaito T, Kashii M, Matsuo Y, Sugiura T, Iwasaki M, Yoshikawa H. Effect of Intermittent Administration of Teriparatide (Parathyroid Hormone 1-34) on Bone Morphogenetic Protein-Induced Bone Formation in a Rat Model of Spinal Fusion. *J Bone Joint Surg Am.* 2014; 96(13): e107.
- 102 . Sasano Y, Kamakura S, Homma H, Suzuki O, Mizoguchi I, Kagayama M. Implanted octacalcium phosphate (OCP) stimulates osteogenesis by osteoblastic cells and/or committed osteoprogenitors in rat calvarial periosteum. *Anat Rec.* 1999; 256(1): 1-6.
- 103 . Miettinen H, Makela EA, Vainio J, Rokkanen P, Tormala P. The effect of an intramedullary biodegradable self-reinforced polyglycolic acid implant on tubular bone. An experimental study on growing dogs. *J Biomater Sci Polym Ed.* 1992; 3(6): 435-42.
- 104 . Zhang R, Ma PX. Poly(alpha-hydroxyl acids)/hydroxyapatite porous composites for bone-tissue engineering. I. Preparation and morphology. *J Biomed Mater Res.* 1999; 44(4): 446-55.
- 105 . Khayyat F, Nemati S, Kiani S, Hojjati Emami S, Baharvand H. Behaviour of human induced pluripotent stem cell-derived neural progenitors on collagen scaffolds varied in freezing temperature and laminin concentration. *Cell J.* 2014; 16(1): 53-62.
- 106 . 川添直輝, 陳国平. 足場材料の構造制御と複合化技術. 辻賢司 編. 再生医療用足場材料の開発と市場: 株式会社シーエムシー出版; 2016. p. 14-23.
- 107 . Griffey S, Schwade ND, Wright CG. Particulate dermal matrix as an injectable soft tissue replacement material. *J Biomed Mater Res.* 2001; 58(1): 10-5.
- 108 . Thein-Han W, Xu HH. Collagen-calcium phosphate cement scaffolds seeded with umbilical cord stem cells for bone tissue engineering. *Tissue Eng Part A.* 2011; 17(23-24): 2943-54.
- 109 . Pfeiffer E, Vickers SM, Frank E, Grodzinsky AJ, Spector M. The effects of glycosaminoglycan content on the compressive modulus of cartilage engineered in type II collagen scaffolds. *Osteoarthritis Cartilage.* 2008; 16(10): 1237-44.
- 110 . Evans CE, Mylchreest S, Andrew JG. Age of donor alters the effect of cyclic hydrostatic pressure on production by human macrophages and osteoblasts of sRANKL, OPG and RANK. *BMC Musculoskelet Disord.* 2006; 7:21.



- 111 . Goodman SB, Huie P, Song Y, Schurman D, Maloney W, Woolson S, Sibley R Cellular profile and cytokine production at prosthetic interfaces. Study of tissues retrieved from revised hip and knee replacements. *J Bone Joint Surg Br.* 1998; 80(3): 531-9.
- 112 . 遠藤一彦, 松田浩一, 安彦善裕, 大野弘機, 賀来亭. 医用金属材料の腐食と生体反応. *Zairyou-to-Kankyou.* 1998; 46: 682-90.
- 113 . Arnoczky SP, DiCarlo EF, O'Brien SJ, Warren RF. Cellular repopulation of deep-frozen meniscal autografts: an experimental study in the dog. *Arthroscopy.* 1992; 8(4): 428-36.
- 114 . Masuda T, Kawai T, Anada T, Kamakura S, Suzuki O. Quality of regenerated bone enhanced by implantation of octacalcium phosphate-collagen composite. *Tissue Eng Part C Methods.* 2010; 16(3): 471-8.
- 115 . Pinholt EM, Ruyter IE, Haanaes HR, Bang G. Chemical, physical, and histologic studies on four commercial apatites used for alveolar ridge augmentation. *J Oral Maxillofac Surg.* 1992;50(8): 859-67; discussion 67-8.
- 116 . Wada Y, Amiel M, Harwood F, Moriya H, Amiel D. Architectural remodeling in deep frozen meniscal allografts after total meniscectomy. *Arthroscopy.* 1998; 14(3): 250-7.
- 117 . Koseki T, Kitabatake N, Doi E. Freezing denaturation of ovalbumin at acid pH. *J Biochem.* 1990; 107(3): 389-94.
- 118 . Lee SL. Optimal conditions for long term storage of native collagens. *Coll Relat Res.* 1983; 3(4): 305-15.

# 業績

(学位論文に関する研究業績)

## 1 学術論文 (査読付き)

- 1.1 Yanagisawa T, Yasuda A, Makkonen RI, Kamakura S. Appositional bone formation of octacalcium phosphate and collagen composite-covered poly-lactic acid cage. Clinical and Experimental Dental Research 6(4):391-99, 2020. DOI: 10.1002/cre2.287
- 1.2 Yanagisawa T, Yasuda A, Makkonen RI, Kamakura S. Influence of pre-freezing conditions of octacalcium phosphate and collagen composite for reproducible appositional bone formation J Biomed Mater Res B Appl Biomater 108(7):2827-34, 2020. DOI: 10.1002/jbm.b.34613

## 2 国際会議

- 2.1 Yanagisawa T, Yasuda A, Kamakura S  
Vertical bone formation of OCP/Collagen covered poly-lactic acid cage  
Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society (TERMIS) 2019 Asia Pacific meeting (14 - 17 October, 2019; Brisbane, Australia)

## 3 国内会議

- 3.1 柳沢俊樹、鎌倉慎治  
PLLA ケージで被覆したリン酸オクタカルシウム・コラーゲン複合体の垂直的骨増生  
第62回 (社) 日本口腔外科学会総会・学術大会 (2018年11月 2~4 日 : 千葉)
- 3.2 柳沢俊樹、安田彩人、鎌倉慎治  
PLA ケージで被覆した OCP/Col の垂直的骨増生  
第40回日本バイオマテリアル学会大会 (2018年11月 12~13 日 : 神戸)
- 3.3 柳沢俊樹、安田彩人、鎌倉慎治  
PLA ケージで被覆した OCP/Col の垂直的骨増生  
第18回日本再生医療学会総会 (2019年 3 月21日 ~23 日 : 神戸)
- 3.4 柳沢俊樹、安田彩人、鎌倉慎治  
オクタカルシウムフォスフェート・コラーゲン複合体 (OCP/Col) の垂直的骨増生  
第64回 (社) 日本口腔外科学会総会・学術大会 (2019年10月 25~27 日 : 札幌)
- 3.5 柳沢俊樹、安田彩人、鎌倉慎治  
オクタカルシウムフォスフェート・コラーゲン複合体 (OCP/Col) の垂直的骨増生  
第41回日本バイオマテリアル学会大会 (2019年11月 24~26 日 : つくば)

### 3.6 柳沢俊樹，安田綾人，鎌倉慎治

オクタカルシウムフォスフェート・コラーゲン複合体（OCP/Col）の垂直的骨増生  
第19回日本再生医療学会総会（On line 2020 年 5 月 18 日 ~29 日）

### 4. 特許

特願 2020-009277 多孔質複合体 鎌倉慎治、柳沢俊樹、中山翔平、岩井敦史 東洋  
紡株式会社、東北大学 2020年 1 月 23 日

## その他の研究業績

### 1 学術論文

- 1.1 Kouketsu A, Matsui K, Kawai T, Ezoe Y, Yanagisawa T, Yasuda A, Takahashi T, Kamakura S.  
Octacalcium phosphate collagen composite stimulates the expression and activity of osteogenic  
factors to promote bone regeneration.

J Tissue Eng Regen Med 14:99-107, 2020. DOI: 10.1002/term.2969

- 1.2 Matsui K, Kawai T, Ezoe Y, Yanagisawa T, Takahashi T, Kamakura S.

Segmental bone reconstruction by octacalcium phosphate collagen composites with  
teriparatide.

Tissue Eng Part A: in press, 2020

### 2 国際会議

- 2.1 Matsui K, Kawai T, Ezoe Y, Yanagisawa T, Yasuda A, Takahashi T, Kamakura S.

Single-Dose Local Administration of Teriparatide with Octacalcium Phosphate Collagen  
Composites Achieved Bony Reconstruction after Canine Mandibular Amputation  
46th European Calcified Tissue Society (ECTS) Congress, May 11-14, 2019, Budapest,  
Hungary

- 2.2 Yasuda A, Kamitakahara M, Yanagisawa T, Kawashita M, Kamakura S

Effect of collagen concentration in preparation process on mechanical properties of octacalcium  
phosphate/collagen composites

Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society (TERMIS) 2019 Asia  
Pacific meeting (14 - 17 October, 2019; Brisbane, Australia)

- 2.3 Matsui K, Kawai T, Ezoe Y, Yanagisawa T, Yasuda A, Takahashi T, Kamakura S.

Reconstruction of Amputated Bone by Teriparatide with OCP/Collagen

Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society (TERMIS) 2019 Asia  
Pacific meeting (14 - 17 October, 2019; Brisbane, Australia)

### 3. 国内会議

- 3.1 松井桂子, 鎌倉慎治, 川井 忠, 江副祐史, 柳沢俊樹, 高橋 哲  
骨形成促進薬併用によるリン酸オクタカルシウム・コラーゲン複合体の骨再生能増強効果  
第62回 (社) 日本口腔外科学会総会・学術大会 (2018年11月 2-4 日 : 千葉)
- 3.2 松井桂子, 鎌倉慎治, 川井 忠, 江副祐史, 柳沢俊樹, 安田彩人, 高橋 哲  
テリパラチドを局所併用した各種骨再生材料によるイヌ下顎骨離断部の骨再生  
第18回日本再生医療学会総会 (2019年 3 月21日～23日 : 神戸)
- 3.3 瀨瀬 衆, 松井 桂子, 川井 忠, 江副 祐史, 柳沢 俊樹、安田 彩人、高橋 哲, 鎌倉 慎治  
ラット頭蓋冠骨欠損に埋入されたリン酸オクタカルシウム/Collagen複合体の骨再生能に関する免疫組織学的評価  
第18回日本再生医療学会総会 (2019年 3 月21日～23日 : 神戸)
- 3.4 安田彩人・上高原理暢・柳沢俊樹・川下将一・鎌倉慎治  
作製時のコラーゲン濃縮率がオクタカルシウムホスフェート・コラーゲン複合体の機械的特性に与える影響  
日本セラミックス協会 2019 年年会 (2019年 3 月24日～26日 : 東京)
- 3.5 鎌倉慎治, 松井桂子, 川井 忠, 江副祐史, 柳沢俊樹, 安田彩人, 高橋 哲  
Teriparatide 局所併用 OCP/Collagen によるイヌ下顎骨離断部の骨再生  
第41回日本バイオマテリアル学会大会 (2019年11月 24~26 日 : つくば)
- 3.6 安田彩人、上高原理暢、柳沢俊樹、川下将一、鎌倉慎治  
オクタカルシウムホスフェート・コラーゲン複合体における作製時の濃縮率が機械的特性へ及ぼす影響  
第41回日本バイオマテリアル学会大会 (2019年11月 24~26 日 : つくば)

## 謝辞

本研究を進めるにあたって、東北大学大学院 医工学研究科 骨再生医工学分野の鎌倉 慎治教授には終始懇切丁寧なご指導ならびにご鞭撻いただきました。実用化と社会貢献を第一と考える熱心な研究姿勢及び現場を知る医師の観点と医学・生物学の観点からの事象の捉え方を身近で教わり、大変貴重な経験となりました。

本論文の審査過程において、東北大学大学院 医工学研究科 医用材料プロセス工学分野の成島尚之教授、東北大学大学院 医工学研究科 生体機能材料プロセス工学分野の山本雅哉教授には、材料科学・工学の様々な角度からご討議・ご助言を頂きました。

本研究に関連して、東北大学大学院 歯学研究科・顎顔面・口腔外科学分野の高橋 哲教授、東北大学大学院 歯学研究科・顎顔面・口腔外科学分野及び岩手医科大学 歯学部口腔外科学分野の川井 忠講師、東北大学大学院 歯学研究科・顎顔面・口腔外科学分野の松井桂子助教、東北大学大学院 歯学研究科・顎顔面・口腔外科学分野の江副祐史助教、宮崎大学 医学部口感覚運動医学講座 顎顔面口腔外科学分野の瀬瀬 衆助教、東北大学大学院 医工学研究科 骨再生医工学分野の安田彩人さん、タンペレ大学 健康科学部の **Ria Makkonen** さんには研究の遂行にあたり、ご助言頂きました。

本研究に用いた試料の作製と特許出願に関して、東洋紡株式会社様にご助言及びご支援頂きました。

また、研究の一部は東北大学病院附属動物実験施設の設備を利用して行いました。東北大学病院附属動物実験施設に在籍している職員の方々からは多大なるご協力を頂きました。

以上の皆様には心から感謝致します。